



Joana Sousa

**Avaliação do impacto da
presença de bactérias no par
tribológico Dente/Zircónia**

Dissertação submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Mestre em**
Engenharia Biomédica – Desporto e Reabilitação

Júri

Presidente Professora Doutora Maria Helena de Figueiredo Ramos Caria, ESS/IPS

Orientador Professor Doutor Célio Gabriel Figueiredo Pina, ESTSetúbal/IPS

Vogal Professora Doutora Ana Mafalda Saldanha Guedes, ESTSetúbal/IPS

23 de Março de 2015



Avaliação do impacto da presença de bactérias no par tribológico Dente/Zircónia

**Dissertação de Mestrado em
Engenharia Biomédica – Desporto e Reabilitação**

Joana Sousa nº120289005

Trabalho orientado por: Prof. Doutor Célio Pina
Prof.^a Doutora Carla Carneiro

Setúbal
2013/2014

Agradecimentos

A elaboração deste trabalho não seria exequível sem o apoio, o empenho e a motivação de distintas pessoas. Por estas circunstâncias, gostaria de expressar todo o meu reconhecimento e estima a todos aqueles que, direta ou indiretamente me apoiaram.

Em primeiro lugar, agradeço aos meus orientados, o Professor Doutor Célio Pina e a Professora Doutora Carla Carneiro por toda a disponibilidade, incentivo, empenho, colaboração, conhecimentos transmitidos, bem como o seu apoio incondicional e compreensão demonstrados.

À *Zirclab* por toda disponibilidade, colaboração e fornecimento de material, sem a qual não seria possível a realização deste trabalho.

À Dina Galhanas e à Patrícia Leitão, técnicas do Laboratório de Microbiologia pela colaboração fundamental na realização da parte experimental e apoio incondicional.

Ao Instituto Superior Técnico e a Professora Doutora Mafalda Guedes pela ajuda e disponibilização o equipamento de MEV.

Agradeço a toda a minha família e namorado pelo apoio, amor, paciência e confiança depositada ao longo destes meses.

Agradeço às minhas amigas, pelo apoio e pela paciência nos momentos de maior desespero. A elas o meu muito obrigado pelo companheirismo e presença constate.

Resumo

A cavidade oral é compreendida como sendo um ecossistema complexo, composto por diversos microrganismos. Neste sentido o *Streptococcus salivarius* foi selecionado como microrganismo representativo da flora bucal e foi estudada a proliferação bacteriana na zircónia e no dente. Posteriormente foi avaliado o impacto do biofilme formado no desgaste dentário durante contacto mecânico.

Procedeu-se em primeiro lugar à caracterização do *Streptococcus salivarius* tendo-se efetuado o estudo do crescimento em meio standard de crescimento, BHI (Brain Heart Infusion). Como se pretendia simular a cavidade oral foi selecionada uma saliva artificial, com diferentes suplementos, para prosseguimento do mesmo. Dos diferentes suplementos utilizados, glucose, extrato de carne e ureia, a glucose foi o que se revelou mais adequado, dado que o perfil de crescimento neste meio foi semelhante ao registado em BHI.

Foi igualmente estudado o efeito da variação do pH no crescimento do *Streptococcus salivarius*, tendo-se verificado que em BHI o crescimento é máximo entre pH 7 e 8 enquanto na saliva suplementada com glucose o pH ótimo é 7. Assim a saliva artificial suplementada com glucose a pH 7 foi selecionada como o meio ótimo de crescimento do *Streptococcus salivarius*.

Foi igualmente efetuado o estudo do efeito da presença de material, dente e zircónia, no pH de crescimento tendo-se registado uma diminuição, para pH 6, do pH ótimo na presença de zircónia.

Os testes de desgaste foram do tipo pino-sobre-placa, com movimento recíproco a uma frequência de 1 Hz e uma temperatura de 37 °C, em saliva artificial suplementada com glucose a pH 7. Foram realizados durante 6 horas tendo-se utilizado como pinos cúspides de dentes pré-molares e de molares, e como placas a zircónia. Terminados os testes foi analisado o coeficiente de atrito e as áreas desgastadas para os vários lubrificantes utilizados: saliva, saliva com glucose e saliva com glucose e *Streptococcus salivarius*. Verificou-se que para o último lubrificante ocorre uma diminuição considerável do coeficiente de atrito, de 0,7 para 0,2 aproximadamente, e uma redução de 50% da área desgastada.

As cúspides foram ainda observadas ao microscópio óptico e no MEV, tendo-

se constatado que cada cúspide é única e que apresentam os mais diversos mecanismos de desgaste nas zonas desgastadas.

Foi assim possível concluir que o biofilme influencia o desgaste uma vez que promove uma diminuição do atrito que por sua vez diminui a área desgastada, pois serve de lubrificante ao meio. Relativamente às placas de zircónia estas não apresentaram quaisquer alterações o que significa que a zircónia não sofre desgaste relevante, mas em contacto com os dentes humanos ajuda a promover o desgaste dos mesmos.

PALAVRAS-CHAVE: Desgaste; Zircónia; Biofilme; *Streptococcus salivarius*.

Abstrat

The oral cavity is understood to be a complex ecosystem comprising various microorganisms. In this sense *Streptococcus salivarius* was selected as representative of oral micro flora and bacterial proliferation was studied in zirconia and the tooth. Subsequently we evaluated the impact of biofilm formed in tooth wear during mechanical contact.

The first procedure was the characterization of *Streptococcus salivarius* having made studies of growth in standard growth medium, BHI (Brain Heart Infusion). As intended to simulate oral cavity was selected an artificial saliva with different supplements. The use of different supplements, glucose, meat extract and urea, glucose was the most appropriate, since the profile of growth on this medium was similar to that recorded in BHI.

It was also studied the effect of pH variation on the growth of *Streptococcus salivarius*, it was found that the growth in BHI is maximum between pH 7 while in saliva supplemented with glucose optimum pH is 7. Thus, the artificial saliva supplemented with glucose at pH 7 was selected as the optimal means of growth of *Streptococcus salivarius*.

Was also performed to study the effect of the presence of material and tooth zirconia, growth pH have been recorded decreased to pH 6, the optimal pH in the presence of zirconia.

Wear tests were pin-plate type with reciprocating motion at a frequency of 1 Hz and a temperature of 37 ° C in artificial saliva supplemented with glucose at pH 7 were performed for 6 hours if used as a taking-pin cusps premolars and molars, as sheets and zirconia. On completion of the tests was analised friction coefficient and the worn areas for the various lubricants used: saliva, saliva and salivary glucose to glucose and *Streptococcus salivarius*. It was found that for the last lubricant occurs a considerable decrease in the coefficient of friction of about 0.7 to 0.2, and a 50% reduction in the abraded area.

The cusps were further observed by optical microscopy and SEM, and it was found that each peak is unique and have the most different wear mechanisms in the

worn areas.

It was therefore possible to conclude that the influence biofilm wear since it promotes a decrease of the friction which in turn decreases the abraded area, it serves as a lubricant to the environment. For the zirconia these plates did not show any changes which means that zirconia does not suffer significant wear, but in contact with human teeth helps to promote the wear of the same.

KEYWORDS: Wear; Zirconia; Biofilm; *Streptococcus salivarius*.

Índice

Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	iv
Abstrat	vi
Lista de Figuras	xi
Lista de Tabelas.....	xiii
Lista de Siglas e Acrónimos.....	xiv
Capítulo 1	1
Enquadramento	1
1.1 Objetivos	2
1.2 Discriminação dos capítulos.....	2
Capítulo 2	3
Introdução teórica	3
2.1 Anatomia e fisiologia da cavidade oral/ dente	3
2.2 Desgaste	6
2.2.1 Mecanismos de desgastes.....	6
a) Desgaste adesivo	6
b) Desgaste abrasivo	7
c) Desgaste por fadiga de superfície	7
2.2.2 Desgaste nos dentes.....	8
2.3 Zircónia	9
2.3.1 Processo de degradação da zircónia	11
2.4 Saliva.....	13
2.5 Microbiota Bucal.....	13
2.5.1 Streptococcus salivarius	14

2.6 Biofilme.....	15
Capítulo 3	18
Materiais e Métodos	18
3.1 Preparação dos dentes e da zircónia	19
• Preparação das cúspides	19
• Preparação da Zircónia.....	20
3.2 Caracterização das superfícies por perfilometria e rugosidade	21
• Determinação do raio de curvatura das cúspides e da tensão de contacto	21
3.3 Determinação dos perfis de crescimento.....	22
3.3.1. Preparação dos meios de cultura	22
3.3.2 Preparação do Inóculo	23
3.3.3 Curvas de crescimento	23
3.3.4. Preparação das amostras para o MEV.....	24
3.4 Ensaio tribológicos	25
Capítulo 4	27
Resultados experimentais	27
Microbiologia.....	27
4.1 Caracterização do microrganismo em estudo - <i>Streptococcus salivarius</i>	27
I. Em meio standard BHI	27
• Efeito do pH.....	28
II. Em Meio Saliva Artificial	29
4.2. Caracterização do <i>Streptococcus salivarius</i> em condições fisiológicas de Saliva artificial suplementada com Glucose.....	31
• Efeito do pH.....	31
• Efeito na presença de Zircónia	32

• Efeito na presença do dente	33
4.3 Impacto do material no crescimento do <i>Streptococcus Salivarius</i> ...	33
4.4 Imagens MEV	34
Materiais e desgaste	35
4.5 Determinação do raio de curvatura e da Tensão de contacto	35
4.6 Rugosidade	35
4.7 Desgaste	36
4.7.1 Coeficiente de atrito	36
4.7.2 Área de desgaste das cúspides.....	37
Capítulo 5	39
Discussão	39
Conclusão	44
Desenvolvimentos Futuros	45
Bibliografia.....	46
Apêndice 1.....	50
Microbiologia	50
Apêndice 2.....	52
Meios de crescimento	52
Apêndice 3.....	54
Crescimento microbiano	54
Apêndice 4.....	56
MEV (Microscópio Eletrónico de Varrimento)	56

Lista de Figuras

Figura 1 – Anatomia da cavidade ora	3
Figura 2 - Representação das arcadas dentárias.....	4
Figura 3 - Representação das diferentes faces do dente	5
Figura 4 - Anatomia do dente	5
Figura 5 - Representação do desgaste adesivo.....	6
Figura 6 - Representação do desgaste abrasivo	7
Figura 7 - Representação do desgaste por fadiga de superfície.....	7
Figura 8 - Representação do desgaste triboquímico.	8
Figura 9 - Estruturas cristalinas da Zircónia: a) moniclinica; b) tetragonal e c) cúbica	9
Figura 10 - Diagrama de fase da Zircónia.	10
Figura 11 - Blocos de cerâmica de zircónia.....	11
Figura 12 - Processo de degradação da zircónia em meio húmido. a) o grão transforma-se e aumenta o volume destacando-se dos outros grãos o que leva a uma quebra de ligações, originado microfissuras; b) e c) a água penetra no material; d) e e) dá-se o processo de nucleação e crescimento finalizando a transformação	12
Figura 13 - Etapas da formação do biofilme: a) adesão e colonização; b) adesão irreversível; c) maturação e d) separação e dispersão das células do biofilme.....	16
Figura 14 - Representação gráfica das diferentes fases de formação do biofilme ao longo do tempo	17
Figura 15 - Ilustração do fluxograma do método de trabalho.....	18
Figura 16 - Seleção dos dentes	19
Figura 17 - a) Representação de 5 cúspides de um dos dentes após o corte; b) representação da serra de diamante	19
Figura 18 - a) Ilustração do molde de resina; b) ilustração do molde de resina com o dente; c) representação do PMMA.	20
Figura 19 - a) Blocos de zircónia; b) representação das placas após o corte; c) representação das placas de zircónia depois de polidas e finalizada	20
Figura 20 - Representação gráfica das siglas da equação	21
Figura 21 - Representação esquemática do protótipo da máquina de desgaste: (a) solução, (b) placa zircónia, e (c) cúspide dente molar.....	25
Figura 22 - Curva de crescimento do Streptococcus salivarius em meio BHI a pH	

7	27
Figura 23 - Curva de crescimento do <i>Streptococcus salivarius</i> em BHI a diferentes pH's.....	28
Figura 24 – Determinação do pH ótimo em BHI.....	28
Figura 25 - Curva de crescimento do <i>Streptococcus salivarius</i> em saliva artificial a pH 7.....	29
Figura 26 - Curva de crescimento do <i>Streptococcus salivarius</i> nas diferentes salivas suplementadas	30
Figura 27 - Representação gráfica da Abs ₆₀₀ vs composição das diferentes salivas	30
Figura 28 - Curva de crescimento em saliva artificial suplementada com glucose a diferentes valores de pH	31
Figura 29 - Determinação do pH ótimo em saliva artificial suplementada com glucose	31
Figura 30 - Curva de crescimento do <i>Streptococcus salivarius</i> na presença de zircónia a diferentes pH's.....	32
Figura 31 - Curva de crescimento em condições fisiológica na presença do dente	33
Figura 32 – Impacto do material (zircónia e dente) no crescimento do <i>Streptococcus salivarius</i>	33
Figura 33 - Imagens MEV do biofilme durante 54 horas de incubação a pH 7 em meio standard BHI (A) e em saliva suplementada com glucose (B)	34
Figura 34 - Representação gráfica do coeficiente de atrito para as diferentes condições	36
Figura 35 - Representação gráfica das áreas desgastadas nos diferentes lubrificantes utilizados.....	37
Figura 36 - Imagens de MEV das pistas de desgaste nos três diferentes meios	38
Figura 37 - Representação gráfica da relação área desgastada vs raio de curvatura	41
Figura 38 - Representação esquemática do que é observado nas imagens de MEV	43
Figura 39 - Ilustração das diferentes formas de bactérias.....	50

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Propriedades dos três tipos de Zircónia estabilizada	10
Tabela 2 - Valor das constantes apresentada as equações (2), (3) e (4)	22
Tabela 3 - Variação do pH para as diferentes curvas	24
Tabela 4 - Condições operacionais dos testes de desgaste	25
Tabela 5 - Composição dos grupos para os testes de desgaste	35
Tabela 6 - Características e valor nutritivos de cada componente dos meios de cultura	52

Lista de Siglas e Acrónimos

BHI – Brian Hear Infusion

SA – Saliva Artificial

SAS – Saliva Artificial Suplementada

MEV – Microscopia Eletrónica de Varrimento

PMMA – polimetilmetacrilato de metilo

R- Raio

h - Altura

w – Peso

a - Tensão de contacto

E – Módulo de Young

σ – Tensão

Ra – rugosidade média da distância de um perfil desde a sua linha média

Capítulo 1

Enquadramento

Ao longo dos anos, tem sido desenvolvida na área da odontologia, a vertente de restauração dentária. Esta evolução manifestou-se de forma marcante nos últimos anos, principalmente no que diz respeito à pesquisa e estudo de novos materiais (DeLong R. 2002, Denry I. 2010). Esta procura está diretamente relacionada com a perda de dentição causada por diversos motivos, o que tem levado à procura de um aperfeiçoamento do restauro, tornando-se o mais natural possível, ou seja, esperando-se que reproduza a textura e translucidez dos dentes originais (DeLong R. 2002, Denry I. 2010).

Na seleção de novos materiais para restaurações dentárias é necessário o conhecimento da sua resistência ao desgaste dado que durante o processo de mastigação e em determinadas patologias, como o bruxismo, existe contacto em movimento relativo dos materiais sob ação de cargas elevadas. O desgaste do material protésico não pode ser elevado nem poderá conduzir a desgaste dentário anómalo (dentes antagonistas) (DeLong R. 2002, Denry I. 2010).

No entanto, o restauro dentário depende não só do tipo de materiais usados, como também é influenciado pelo ambiente da cavidade oral. Na cavidade oral os materiais protésicos são colocados num ambiente composto por fluídos orgânicos e um ecossistema microbiano. No entanto, este último facto não tem sido considerado na execução dos testes tribológicos documentados na literatura (Kim, Oh et al. 2012, Wang L. 2012).

O estudo do género *Streptococcus* é de grande interesse clínico devido ao seu potencial patogénico e no que diz respeito à saúde oral existe particular interesse no grupo dos “*Streptococcus viridans*”. A prevalência da espécie *Streptococcus* na cavidade oral, em que *Streptococcus salivarius* é o mais abundante, foi determinante na seleção do microrganismo para o presente estudo (Amoroso P. 2003).

1.1 Objetivos

O presente estudo visa analisar a influência que o biofilme tem sobre o desgaste dentário. Como já foi estudado sabe-se que o desgaste dentário é a principal causa da existência de fratura nos materiais odontológicos, no entanto, nenhum estudo avalia o efeito que a presença das bactérias, que compõem a cavidade oral, tem sobre estes materiais (Kim, Oh et al. 2012, Wang L. 2012).

Neste sentido, e considerando a complexidade da cavidade oral, deu-se neste estudo principal destaque à bactéria *Streptococcus salivarius* de modo a entender mais facilmente a influência da mesma (como representante de toda a microflora bucal) no desgaste dentário.

Os objetivos de estudo foram em:

- Determinar as condições ótimas de crescimento do *Streptococcus salivarius*;
- Determinar a influência do pH;
- Determinar o efeito do material no crescimento do *Streptococcus salivarius*;
- Determinar condições dos testes de desgaste;
- Determinar a área desgastada e o coeficiente de atrito;
- Determinação dos mecanismos de desgaste a partir de imagens MEV.

1.2 Discriminação dos capítulos

No capítulo 1, é apresentado um pequeno enquadramento do tema da tese, os respetivos objetivos e uma breve descrição dos capítulos.

No capítulo 2, temos a introdução teórica, onde abordamos todos os conceitos e conhecimentos essenciais para o trabalho.

No capítulo 3, aborda-se os materiais e métodos. Neste capítulo estão apresentados os métodos de trabalho bem como todos os materiais e respetiva preparação para se iniciar o trabalho experimental.

No capítulo 4, estão apresentados todos os resultados que foram obtidos ao longo de todo o estudo.

No capítulo 5, temos a discussão de resultados, onde é feita uma pequena análise dos resultados apresentados no capítulo anterior.

Capítulo 2

Introdução teórica

2.1 Anatomia e fisiologia da cavidade oral/ dente

A cavidade oral também designada por boca faz parte da extensão do sistema digestivo e encontra-se rodeada por estruturas dinâmicas, sendo elas, os lábios, as bochechas e os dentes (Pizzato M. 2011). A cavidade oral (Figura 1) encontra-se dividida em duas partes: (1) o vestíbulo da boca que é uma zona idêntica a uma fissura entre os dentes e a gengiva e os lábios e as bochechas; e (2) a cavidade própria da boca que é a região entre os arcos dentais superiores e inferiores, delimitada lateralmente e anteriormente pelos arcos alveolares maxilares e mandibulares, e delimitada superiormente pelo palato (Seeley R. 2003, Velayos J. 2004).

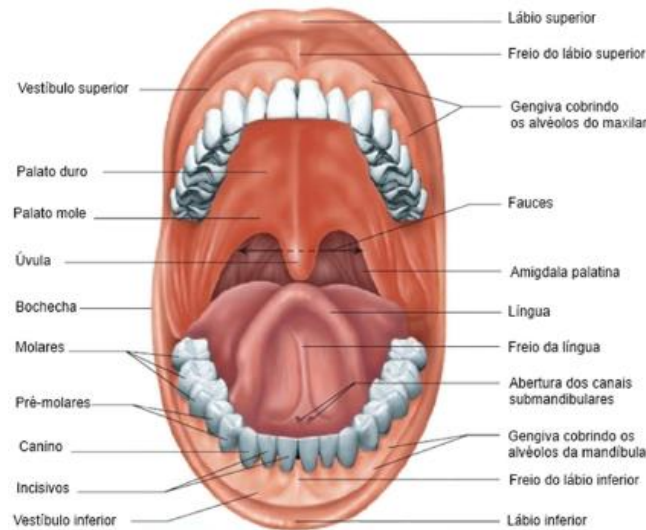


Figura 1 – Anatomia da cavidade oral. (adaptado de (Seeley R. 2003))

Esta exibe múltiplas funções pois, (1) é onde se inicia o sistema digestivo, bem como o processamento do bolo alimentar, com o auxílio de secreções produzidas pelas glândulas salivares; (2) é a zona que controla os sons produzidos pela laringe, originando a voz e por fim (3) intervém nas trocas respiratórias (Seeley R. 2003, Velayos J. 2004). A cavidade oral pode ser entendida como sendo um ecossistema

complexo composto por diversos microrganismos e o característico ambiente quente, húmido e rico em nutrientes, torna-a ideal para o crescimento microbiano, com uma temperatura que ronda os 36°C.

Durante o processo de mastigação, a mandíbula executa movimentos, com uma gama de oclusão que varia entre os 0,1-0,12 s e um deslizamento entre os 0,9-1,2 mm. No decorrer deste processo, a força de mastigação varia de 2 a 150N, podendo atingir 450N, na zona dos molares (Seeley R. 2003, Velayos J. 2004, Figueiredo-Pina 2013). A saliva é o principal componente que promove este processo. Contudo esta pode sofrer variações de pH, que derivam do tipo de alimentos ingeridos, da higiene e da flora bucal de cada ser humano.

A saliva, é no entanto, um tampão fisiológico da cavidade oral, sendo extremamente importante e necessária na eliminação do excesso de ácido ou base auxiliando na manutenção dos valores de pH. Sendo assim, a saliva tem funções, como, (1) lubrificação, (2) auto limpeza da boca, (3) remineralização dos dentes, (4) neutralização dos ácidos bucais, (5) perceção gustativa dos alimentos, (6) digestão do amido e (7) ação antimicrobiana (Seeley R. 2003, Velayos J. 2004, Figueiredo-Pina 2013).

Os dentes são um órgão bastante mineralizado implantado no osso e que apresenta uma estrutura rígida, formando as arcadas dentárias, que desempenham um papel extremamente importante ao nível da fala e da mastigação (Seeley R. 2003, Velayos J. 2004, Pizzato M. 2011). Cada adulto possui 32 dentes, que se encontram divididos em duas arcadas dentárias, nas quais os dentes estão distribuídos de forma simétrica formando quatro quadrantes: o superior direito, inferior direito, superior esquerdo e inferior esquerdo (Figura 2).

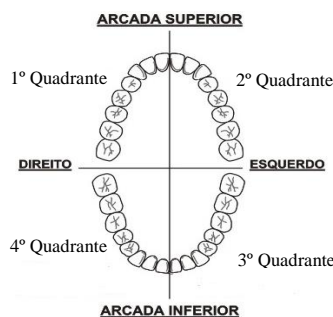


Figura 2 - Representação das arcadas dentárias. (adaptado de <http://www.casalperfeito.com.br/fotos/dentesesq.jpg>)

O dente é constituído por uma coroa, um colo e uma raiz. A coroa é a zona visível do dente, apresentando uma superfície lisa, polida, brilhante e é revestida por esmalte. Esta possui uma ou mais cúspides, que podem ser classificadas como vestibulares (v), linguais (L), distais (D) e mediais (M) (Figura 3) (Seeley R. 2003, Velayos J. 2004).

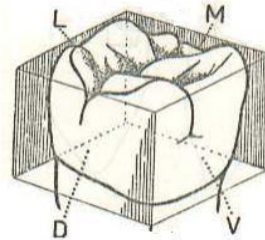


Figura 3 - Representação das diferentes faces do dente. (adaptado de <http://www.hs-menezes.com.br/images/FACESPNG.png>)

Cada dente contém no seu interior a cavidade pulpar, que é preenchida por vasos sanguíneos, nervos e tecido conjuntivo, dando assim origem à polpa (Figura 4). A polpa penetra na raiz, formando o canal radicular. A dentina apresenta uma conformação semelhante à do dente apesar de ser um pouco mais rústica. Esta estrutura é a que dá cor ao dente e contacta, no interior, com a polpa e no exterior com o esmalte (Seeley R. 2003, Velayos J. 2004).

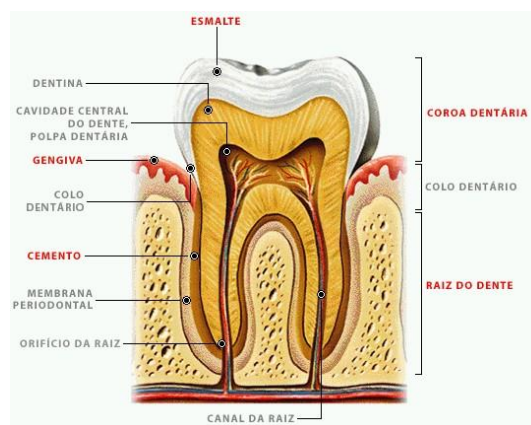


Figura 4 - Anatomia do dente. (adaptado de http://www.labin.unilasalle.edu.br/infoedu/siteinfoedu1_03/turmasv_site/turma2_03/sites/P%DFgina%20Anatomia/Sistema%20digest%BERio/dente.jpg)

O esmalte é considerado como sendo a substância mais rígida e mineralizada do corpo humano sendo a substância que confere proteção aos dentes contra a abrasão e aos ácidos produzidos na boca. É formado por depósito de camadas, que

ocorrem durante o processo de calcificação, sendo os seus principais constituintes o cálcio e o fósforo. Genericamente é constituído por cerca de 96% de minerais, 1% de material orgânico e 3% de água. Por sua vez, a raiz, encontra-se imersa nos alvéolos maxilares e mandibulares, apresentando uma conformação cônica e uma coloração amarelada e sem brilho. Nesta zona do dente a superfície da dentina está envolvida em cimento. O cimento tem como função servir de meio de suporte do dente ao maxilar. Este é um elemento do periodonto, uma vez que em conjunto com o osso suporta as fibras do ligamento periodontal (Seeley R. 2003, Velayos J. 2004).

2.2 Desgaste

O desgaste é definido como sendo a “perda progressiva de matéria da superfície de um corpo solido devido ao contacto e movimento relativo com outro corpo sólido líquido ou gasoso” (Lambrechts P. 2006). Ou seja, o desgaste é essencialmente um fenómeno superficial, que envolve remoção mecânica indesejada de material. Existem vários fatores que influenciam o processo de desgaste, nomeadamente, o tipo de movimento, o tamanho de partículas, a dureza, a temperatura e o meio envolvente (Lambrechts P. 2006, Ghazal M. 2008). São quatro os mecanismos de desgaste: desgaste adesivo, desgaste abrasivo, desgaste por fadiga de superfície e desgaste triboquímico (Lambrechts P. 2006, Ghazal M. 2008).

2.2.1 Mecanismos de desgastes

a) Desgaste adesivo

Este tipo de desgaste verifica-se entre superfícies sólidas que estejam em contacto, o que origina a transferência de material entre as duas superfícies (Figura 5).

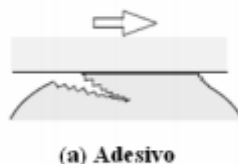


Figura 5 - Representação do desgaste adesivo. (adaptado de (Radi P. 2007))

Este tipo de desgaste é influenciado por alguns fenômenos, tais como, a existência de lubrificante, a rugosidade da superfície, entre outros (Lambrechts P. 2006, Radi P. 2007, Ghazal M. 2008).

b) Desgaste abrasivo

O desgaste abrasivo resulta do deslizamento entre superfícies diferentes, resultando na danificação da superfície menos dura (Figura 6).

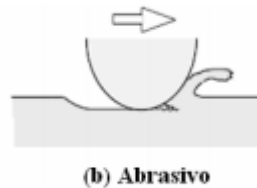


Figura 6 - Representação do desgaste abrasivo. (adaptado de (Radi P. 2007))

A literatura refere que este desgaste, patológico, da estrutura dentária deriva de processos biomecânicos, resultantes da utilização de objetos ou substâncias que contactem de forma frequente com as superfícies dos dentes. Pode ocorrer durante a mastigação e é influenciado pela abrasividade das partículas que compõem os alimentos (Lambrechts P. 2006, Radi P. 2007, Ghazal M. 2008).

A abrasão está também diretamente relacionada com a higiene oral, ou seja, é provocada pela utilização de métodos de escovagem traumáticos, a técnica que é utilizada durante a escovagem, o tempo e a frequência de escovagem, o pH, o potencial abrasivos do dentífrico utilizado e por fim o uso excessivo de fio dental (Lambrechts P. 2006, Radi P. 2007, Ghazal M. 2008).

c) Desgaste por fadiga de superfície

O desgaste por fadiga distingue-se pela formação de fraturas e pela delaminação do material, que é provocado pelas variações de ciclos de carga na superfície do material (Figura 7) (Lambrechts P. 2006, Radi P. 2007, Ghazal M. 2008).



Figura 7 - Representação do desgaste por fadiga de superfície. (adaptado de (Radi P. 2007))

d) Desgaste triboquímico

O desgaste triboquímico ocorre entre duas superfícies (Figura 8). Neste caso é possível verificar a formação de produtos de reação originado pelas interações tribológicas (Lambrechts P. 2006, Radi P. 2007, Ghazal M. 2008).

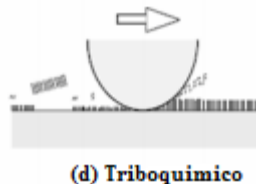


Figura 8 - Representação do desgaste triboquímico. (adaptado de (Radi P. 2007))

2.2.2 Desgaste nos dentes

O desgaste nos dentes ocorre na superfície oclusal da coroa do dente durante o processo de mastigação. Quando o desgaste é em excesso, este pode provocar redução das funções mastigatórias, bem como originar alguns distúrbios orais, tais como, sensibilidade dentária. O desgaste nos dentes é um processo muito complexo que envolve reações químicas, mecânicas e térmicas, que com o envelhecimento tem tendência a ser agravado (Lambrechts P. 2006, Zheng and Zhou 2006, Zheng and Zhou 2007).

A nomenclatura da medicina dentária, designa o desgaste dentário como sendo o desgaste por atrito, abrasão e erosão. No atrito, a perda de superfície do dente com dente, ou dente com o restaurador é muitas vezes considerado como desgaste de dois corpos. Já a abrasão é causada pela circulação dos alimentos sobre a superfície dos dentes no decorrer da mastigação, bem como pela interação de superfícies da escova e da pasta. Por fim, a erosão define-se como sendo a perda da estrutura do dente devido a efeitos químicos (Lambrechts P. 2006, Zheng and Zhou 2006, Zheng and Zhou 2007).

Assim o desgaste é um processo multifatorial e na maioria dos casos é de difícil perceção e controle. Sendo assim, é de extrema importância identificar a etiologia do desgaste, com o intuito de obter uma otimização no diagnóstico e no tratamento de restauros dentários (Lambrechts P. 2006, Zheng and Zhou 2006, Zheng and Zhou 2007).

2.3 Zircónia

A zircónia (ZrO_2) é um material que se tem vindo a destacar nas áreas da engenharia, da saúde e também da odontologia, pois é considerada como sendo um excelente material, uma vez que, é biocompatível, bionerte, com alta resistência mecânica e apresenta uma boa estabilidade química. Este material surgiu na área da odontologia desde 1717 com o intuito de vir a substituir as estruturas metálicas das próteses uma vez que também apresentava melhores propriedades estéticas e biológicas (Chevalier J. 2006, Denry I. 2008).

Contudo, a zircónia é um material polimórfico, podendo apresentar três estruturas cristalinas dependendo das condições de temperatura e pressão (Figura 9). As estruturas cristalinas são (1) a monoclinica, estável à temperatura ambiente, (2) a tetragonal, estável entre os 1170 °C e os 2370 °C, e por fim (3) a cúbica estável até 2600 °C. A fase tetragonal é a que apresenta melhores propriedades mecânicas.

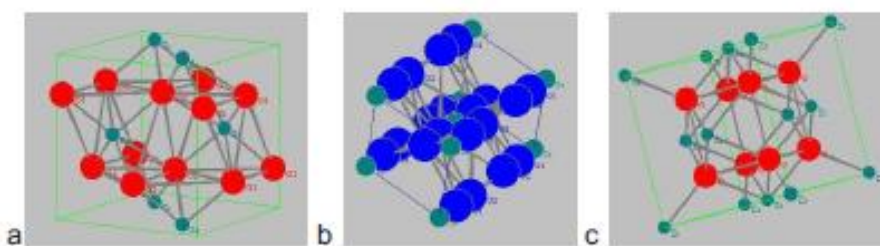


Figura 9 - Estruturas cristalinas da Zircónia: a) monoclinica; b) tetragonal e c) cúbica. (adaptado de (Moraes M. 2004))

A transformação martensítica ocorre quando se dá o arrefecimento da zircónia através de um processo sem difusão, envolvendo unicamente o transporte de átomos e a reorganização da rede cristalina da zircónia. Esta transformação leva à ocorrência de uma expansão volumétrica de 3-5%, sendo suficiente para exceder o limite da deformação elástica, o que pode levar à formação de fraturas tornando a utilização da zircónia inviável. Contudo, esta transformação pode ser influenciada por diversos fatores, tais como, temperatura, processo de desgaste, defeitos, partículas e tamanho dos grãos (Chevalier J. 2006, Denry I. 2008, Silva C. 2009, Andreiuolo R. 2011, Seidl M. 2011).

De modo a tornar viável a zircónia é necessário proceder-se à adição de alguns óxidos que servem de estabilizadores das fases tetragonal e cúbica (Chevalier J. 2006, Andreiuolo R. 2011). Assim, e de acordo, com a quantidade de óxido

estabilizante adicionado, a zircónia pode existir em três formas: (1) zircónia reforçada com alumina (ZTA), (2) zircónia tetragonal policristalina estabilizada por itria (Y-TZP) e por fim (3) zircónia parcialmente estabilizada por magnésia (Mg-PSZ). Estes três tipos de zircónia estabilizada possuem características excepcionais, tais como, alta resistência à flexão e tenacidade à fratura, alta dureza, excelente resistência química e boa condutividade iónica. Contudo, a estabilização com itria é a mais utilizada na odontologia, pois apresenta uma resistência à flexão de 950 MPa (Tabela 1) (Chevalier J. 2006, Denry I. 2008, Silva C. 2009, Andreiuolo R. 2011, Seidl M. 2011).

Tabela 1 - Propriedades dos três tipos de Zircónia estabilizada. (adaptado de (Campos A. 2012))

Propriedades	(ZTA)	Y-Mg-PSZ	Y-TZP
Módulo de Young (GPa)	210	210	210
Resistência à flexão (MPa)	200	600	950
(Dureza Vickers (HV)	1,25	1,25	1,25

A zircónia tetragonal policristalina (TZP) é a mais utilizada. Esta apresenta uma pequena percentagem de itria, zircónia pura e é obtida a uma temperatura de 1000°C, o que origina a fase tetragonal. A temperatura de sinterização influencia o tamanho de grão, sendo que a baixas temperaturas os grãos são de menor dimensão. A formação da fase tetragonal pode ocorrer, aproximadamente, aos 520°C até uma percentagem de aproximadamente 2.5% mol de itria como é possível ver no diagrama de fases zircónia-ítria (Figura 10) (Piconi C. 1999, Chevalier J. 2006, Kalin M. 2006, Denry I. 2008, Kelly J. 2008).

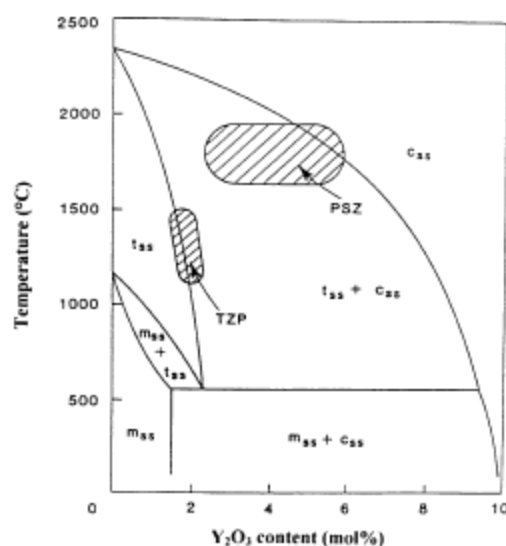


Figura 10 - Diagrama de fase da Zircónia. (adaptado de (Piconi C. 1999))

A zircónia (TZP) é obtida a partir de blocos de cerâmica de zircónia, que podem ser parcialmente ou totalmente sinterizados (Figura 11). A zircónia parcialmente sinterizada é a mais utilizada e é maquinada em tamanhos superiores ao tamanho da prótese final, devido a contração posterior (Piconi C. 1999, Chevalier J. 2006, Kalin M. 2006, Denry I. 2008, Kelly J. 2008, Andreiuolo R. 2011).



Figura 11 - Blocos de cerâmica de zircónia (adaptado de <http://portuguese.alibaba.com/product-gs/sirona-inlab-system-translucent-zirconia-block-520849341.html>)

2.3.1 Processo de degradação da zircónia

As restaurações dentárias e os implantes estão localizados num ambiente relativamente agressivo, a cavidade oral. Este facto pode levar à ocorrência de desgaste nos mesmos, desgaste de origem química ou mecânica. Um dos principais fatores de desgaste é causado pelos dentífricos que promovem um desgaste abrasivo (Piconi C. 1999, Chevalier J. 2006, Kalin M. 2006, Denry I. 2008, Kelly J. 2008).

O processo de degradação dos materiais de restauro não é de fácil determinação, pois devem-se a diversos fatores, sendo que os químicos são os mais importantes em muitos dos mecanismos de desgaste (Piconi C. 1999, Chevalier J. 2006, Kalin M. 2006, Denry I. 2008, Kelly J. 2008).

No caso da zircónia, esta é uma cerâmica sensível à degradação a baixas temperaturas. A sua degradação ocorre por uma transformação desacelerada da superfície passando para a fase monoclínica estável na presença de água ou de vapor de água. Esta transformação é iniciada em grãos isolados, o que significa que existe um desequilíbrio, ou seja, existe uma menor concentração de itria, bem como a presença de tensões residuais ou até pode estar presente a fase cúbica (Piconi C. 1999, Chevalier J. 2006, Kalin M. 2006, Denry I. 2008, Kelly J. 2008).

Esta transformação apresenta assim algumas consequências (Figura 12).

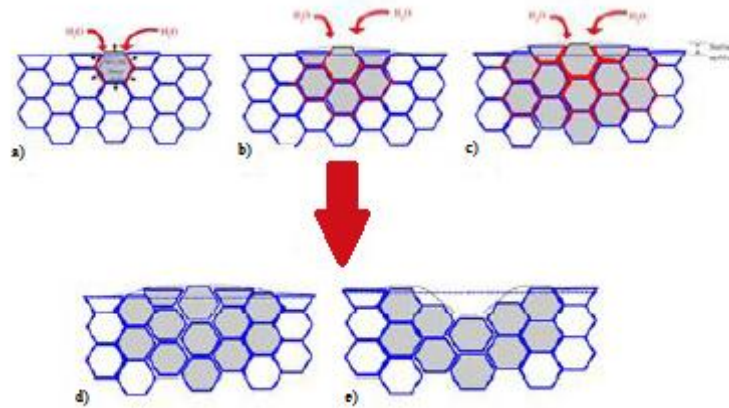


Figura 12 - Processo de degradação da zircónia em meio húmido. a) o grão transforma-se e aumenta o volume destacando-se dos outros grãos o que leva a uma quebra de ligações, originado microfissuras; b) e c) a água penetra no material; d) e e) dá-se o processo de nucleação e crescimento finalizando a transformação (Piconi C. 1999)

A produção deste tipo de cerâmicos tem diferentes processos de produção que confere diferentes características microestruturais. Alguns autores relatam, que o tamanho do grão influencia bastante a transformação de fase e que com a diminuição do mesmo esta fase pode ser retratada, sendo este fator importante ao nível da resistência ao desgaste do material (Piconi C. 1999, Chevalier J. 2006, Kalin M. 2006, Denry I. 2008, Kelly J. 2008).

O tamanho de grão, a concentração de itria, a sua distribuição e a tenacidade influencia o comportamento tribológico da zircónia tetragonal policristalina estabilizada com itria. É também referenciado em diversos estudos que a resistência à fratura é de extrema importância no comportamento tribológico de cerâmicos na área da engenharia, uma vez que o desgaste aumenta com a diminuição da resistência à fratura.

Assim o desgaste corresponde à transformação da fase tetragonal para a fase monoclinica (Piconi C. 1999, Chevalier J. 2006, Kalin M. 2006, Denry I. 2008, Kelly J. 2008).

2.4 Saliva

A saliva é considerada como sendo um fator relevante no que diz respeito ao desgaste dentário. Esta é produzida por três glândulas salivares, designadas por sublinguais, submandibulares e por fim pelas parótidas. Este meio é maioritariamente composto por água e por uma pequena parte de moléculas e vários tipos de iões (Leung V. 1997, Aps J. K. 2005, Aguiar S. 2011).

A saliva desempenha diversas funções, para além de iniciar o processo de digestão dos alimentos, é também responsável pela higiene oral da boca. Esta função protetiva resulta de proteínas com ação antibacteriana, que para além da mucina, existem glicoproteínas que possuem um papel muito importante nesta ação antimicrobiana. Estas proteínas também permitem a formação de uma barreira contra microorganismo ou podem até mesmo bloquear as bactérias que se ligam a recetores das células epiteliais (Leung V. 1997, Aps J. K. 2005, Aguiar S. 2011). O pH da saliva humana é 6,7 podendo variar de 6,2 a 7,6 dependendo da velocidade de produção de saliva. (Aguiar S. 2011).

2.5 Microbiota Bucal

As bactérias colonizam os seres vivos e cada parte do corpo apresenta uma microflora característica, o microbiota, existindo cerca de 10 vezes mais bactérias do que células comuns. O microbiota humano é muito variável de indivíduo para indivíduo e depende de vários fatores, tais como, idade, dieta, saúde, estado emocional, condições ambientais, localização geográfica, higiene, estilo de vida entre outras. Esta variação pode, eventualmente, levar ao aparecimento de doenças (Richard J. 2006).

Imediatamente após o nascimento de um bebé a colonização inicia-se através da respiração e da alimentação. Nesta altura, a boca de um bebé é formada por uma mucosa lisa e arejada, colonizada por bactérias aeróbias e anaeróbias. Com o crescimento, o microbiota bucal vai sendo colonizado por *Streptococcus spp*, especificamente pela espécie *Streptococcus salivarius*, dada a sua grande afinidade com a mucosa (Richard J. 2006).

Apesar de algumas destas bactérias serem patogénicas, isto é provocam doenças, são também essenciais para a manutenção do equilíbrio entre as diversas

espécies. As bactérias não patogénicas promovem o equilíbrio da saúde (Murray P. 1998, Richard J. 2006, Brooks J. 2007).

A cavidade oral é bastante complexa e alberga uma grande variedade de bactérias, determinada pelo pH e tipo de alimentação seguida (Murray P. 1998, Richard J. 2006, Brooks J. 2007).

Apesar do microbiota bucal variar de indivíduo para indivíduo existem bactérias comuns presentes, são elas (Murray P. 1998, Richard J. 2006, Brooks J. 2007).

1. *Streptococcus viridantes*, onde estão incluídas as espécies *salivarius*, *mitis*, *mutans*, *sanguis*, definidos como cocos Gram-positivos. São os responsáveis pela cárie dentária, em particular a espécie *mutans* que por produção de ácido láctico leva à dissolução do cálcio do dente (Patterson M. 1996, Richard J. 2006);
2. *Neisseria spp* são bactérias que se encontram aos pares e são consideradas como Gram-negativas, estando presentes no nosso sistema respiratório (Oliveira A. 2004);
3. *Actinomyces spp* uma espécie anaeróbia e Gram-positiva. Existem na cavidade oral bem como no trato gastrointestinal (Paço R. 2003);
4. *Candida albicans* é uma levedura encontrada no dorso da língua, e também pode ser encontrada nas bochechas, na gengiva e no palato apesar de nestas regiões ser menos frequente (Richard J. 2006).

O microbiota bucal geralmente é não patogénico, no entanto, sempre que existem desequilíbrios estes podem levar a ocorrência de infeções orais que quando não tratadas podem invadir outros sistemas (Patterson M. 1996, Murray P. 1998, Richard J. 2006).

O microbiota bucal coloniza todos os tecidos da boca, quer sejam naturais ou implantes pelo que o biofilme que estabelece contacto com o implante apresenta um microbiota complexo tal como referido em (Romeiro R. 2010).

2.5.1 Streptococcus salivarius

Streptococcus são cocos gram-positivos que se dividem ao longo de um único eixo e apresentam um crescimento em pares ou em cadeia. Muitas das espécies de *Streptococcus* são consideradas não patogénicas pois fazem parte da microflora da

boca, pele, intestinos e sistema respiratório. No entanto, existem algumas espécies nocivas para o ser humano que podem provocar doenças graves, tais como, meningites, pneumonias entre outras (Yu C. 2013).

Os *Streptococcus* são uma espécie de bactérias bastante exigentes a nível nutricional, pois requerem meios bastante ricos de crescimento, geralmente suplementados com sangue, e uma temperatura de 37°C para se obter um crescimento ótimo (Yu C. 2013).

O ecossistema da cavidade oral é um dos ambientes conhecidos mais complexos, em que aproximadamente 6% da população bacteriana pertence à espécie *Streptococcus*, de entre as várias espécies o *Streptococcus salivarius* é mais predominante na cavidade oral, mais especificamente no dorso da língua e na mucosa da faringe (Horz H. and Conrads 2007). A sua presença é permanente, uma vez que apresentam sistemas de adesão, tais como, pili, fibrilas e proteínas de ligação da saliva (Roger P. 2011).

2.6 Biofilme

A placa bacteriana é definida como sendo a formação de uma camada que compreende centenas de espécies microbianas que se organizam em diversas comunidades e que aderem a tecidos duros e moles da boca. Ou seja, a placa bacteriana é um biofilme composto por uma comunidade de bactérias bem estruturadas que aderem a superfícies húmidas e que se encontram fechadas numa matriz polimérica e que apresenta, normalmente, uma espessura entre 5-200µm (Bossolan N. 2002, Xavier J. 2002, Carvalho I. 2010, Santos A. 2010, Teixeira K. 2010).

Na cavidade oral, o biofilme contém microrganismos que se encontram sobre um película que contém glicoproteínas salivares, fosfoproteínas, lipídios e outros componentes do fluido gengival (Bossolan N. 2002, Xavier J. 2002, Carvalho I. 2010, Santos A. 2010, Teixeira K. 2010).

No entanto, o biofilme forma-se através de um processo que inclui quatro etapas distintas (Figura 13) (Bossolan N. 2002, Xavier J. 2002, Carvalho I. 2010, Santos A. 2010, Teixeira K. 2010).

a) Adesão e colonização

Esta primeira etapa leva ao contacto benéfico entre a superfície e os microrganismos. Contudo, este tipo de adesão é considerado um processo reversível que envolve uma aproximação de um organismo à superfície, de forma aleatória ou através de mecanismos de quimiotaxia (processo de locomoção de células na direção de um gradiente químico) e de mobilidade celular.

b) Adesão irreversível

Nesta etapa, ocorre a adesão irreversível, durante a qual as bactérias começam a aderir a proteínas, e os microrganismos começam a produzir ligações intercelulares formando uma matriz polimérica. Esta matriz é um hidrogel bastante complexo que incorpora comunidades de bactérias, sendo essencialmente composto por polissacarídeos produzidos pelas mesmas. A matriz exerce a função de camada protetora e conservadora do microambiente.

c) Maturação

Terminada a adesão irreversível, o processo de maturação do biofilme inicia-se. Este começa a replicar-se de forma ativa e os componentes gerados pelas bactérias começam a interagir com as moléculas orgânicas e inorgânicas, com o intuito de originar o glicocálix.

d) Separação e dispersão das células do biofilme

Nesta última etapa, o biofilme pode sofrer erosão. A erosão ocorre à medida que o biofilme cresce, pois a camada mais externa do biofilme liberta microrganismos que se dispersam e multiplicam, dando origem a novas colónias, ou seja, a novos biofilmes.

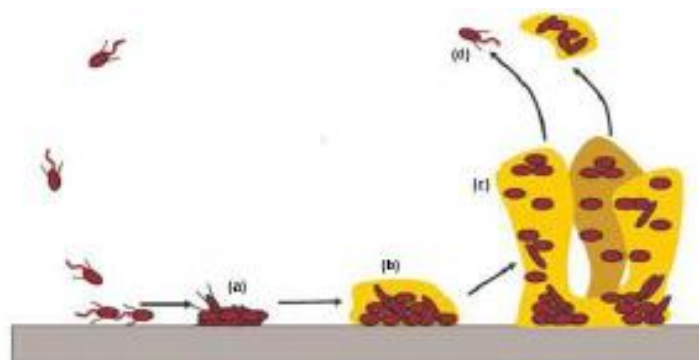


Figura 13 - Etapas da formação do biofilme: a) adesão e colonização; b) adesão irreversível; c) maturação e d) separação e dispersão das células do biofilme. (adaptado de(Bossolan N. 2002))

Na figura 14 pode-se ver as diferentes fases de formação do biofilme ao longo do tempo até à sua dispersão.



Figura 14 - Representação gráfica das diferentes fases de formação do biofilme ao longo do tempo (adaptado de <http://www.associacaoamigosdagrandeidade.com/revista/wp-content/uploads/Figura-6.jpg>)

No entanto, o biofilme pode ser influenciado por diversos fatores, desde fatores químicos, físicos e biológicos. Os fatores químicos levam à separação do biofilme devido à ausência de nutrientes ou de oxigénio e a alterações de pH. O valor de pH é de extrema importância, pois para grande parte dos microrganismos o pH ideal é o pH neutro, mas este também depende do tipo de microrganismo. Assim sendo, os microrganismos que aderem às superfícies são afetados pelo pH, o que pode levar a alterações ao nível da repulsão electrostática, provocando alterações na etapa de adesão do biofilme. Os fatores físicos incluem as tensões de corte exercidas sobre a matriz polimérica e a pressão osmótica no interior do biofilme. Por fim, os fatores biológicos podem ser considerados quando alguns microrganismos excretam substâncias nocivas para o consórcio bacteriano que compõe este mesmo biofilme.

Desta forma a gravidade e incidência do biofilme podem ser reduzidas por meio de controlo da placa supragengival e por uma correta higiene oral ((Bossolan N. 2002, Xavier J. 2002, Carvalho I. 2010, Santos A. 2010, Teixeira K. 2010).

Capítulo 3

Materiais e Métodos

Na Figura 15 encontra-se representado o fluxograma do método de trabalho da presente tese. Este dividiu-se em duas etapas principais do estudo, sendo elas (1) a caracterização do *Streptococcus salivarius* e determinação das condições ótimas de crescimento e (2) os ensaios de desgaste.

Na caracterização do *Streptococcus salivarius* foram determinados os perfis de crescimento nos meios BHI (Brain Heart Infusion), saliva artificial e saliva artificial suplementada com glucose, ureia e extrato de carne. Foi ainda efetuado o estudo do efeito do pH no meio BHI.

Determinadas as condições fisiológicas ótimas, saliva suplementada com glucose, foi efetuado o estudo do efeito do pH e da presença de material (zircónia e dente) no crescimento do *Streptococcus salivarius*.

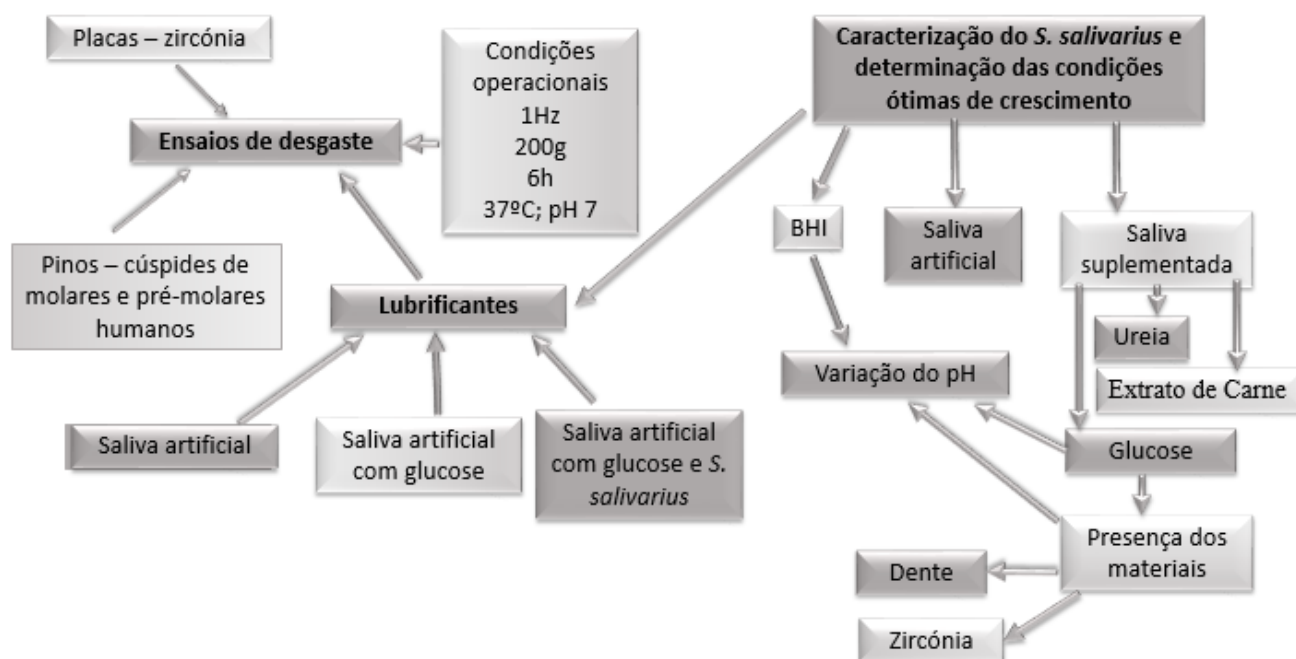


Figura 15 - Ilustração do fluxograma do método de trabalho

Os procedimentos para a realização dos estudos anteriormente referidos encontram-se apresentados na secção 3.2. os quais permitiram a obtenção das condições ótimas de crescimento do *Streptococcus salivarius*, tendo sido efetuados, de seguida, os ensaios de desgaste cuja preparação de materiais está descrita a secção 3.1 e as condições do ensaio na secção 3.3.

3.1 Preparação dos dentes e da zircónia

- **Preparação das cúspides**

Dado que o material de estudo são dentes antes de se dar início à parte experimental, foi necessário proceder à recolha e seleção dos mesmos, molares e pré-molares humanos, em clínicas dentárias que gentilmente cederam os dentes que tinham disponíveis. A seleção dos dentes foi feita de modo a que os testes fossem feitos com dentes do mesmo quadrante, ou seja, todos do 4º quadrante tal como mostra a figura 2. Estes também não podiam apresentar cáries ou qualquer outro tipo de defeito. (Figura 16).

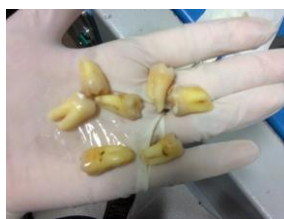


Figura 16 - Seleção dos dentes

Os dentes escolhidos foram cortados ao longo da linha divisória, em quatro ou cinco cúspides, com o auxílio de uma serra de diamante e um micromotor Dentalfarm HP35 Multifuncion, na empresa Zirclab (Figura 17).

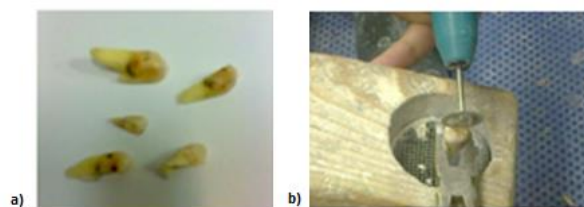


Figura 17 - a) Representação de 5 cúspides de um dos dentes após o corte; b) representação da serra de diamante

Finalizado o corte dos dentes, foi identificada cada uma das cúspides e deu-se início à incorporação de cada cúspide num molde de resina acrílica à base de PMMA (polimetacrilato de metilo) (Figura 18). Os moldes foram feitos com a forma do suporte da máquina de ensaios de desgaste.



Figura 18 - a) Ilustração do molde de resina; b) ilustração do molde de resina com o dente; c) representação do PMMA.

Feitos os moldes procedeu-se à numeração das cúspides. Como cada dente era composto por 4 ou 5 cúspides, assumiu-se que numerava-se os diferentes dente com 1, 2 e 3 e depois diferenciava-se as cúspides com letras, por exemplo a, b e c. Sendo assim, um exemplo da numeração é para o dente 1 tínhamos 1a, 1b, 1c.

• **Preparação da Zircónia**

A Zirclab cedeu placas de zircónia (Figura 19) e estas foram cortadas com o auxílio da serra e do micromotor descrito anteriormente, com medidas de 1x1 cm e 1,5x1,5 cm. Terminado o corte das placas, a superfície foi polida com uma lixa e foram posteriormente sinterizadas, o que levou a uma ligeira redução do tamanho de cada placa.

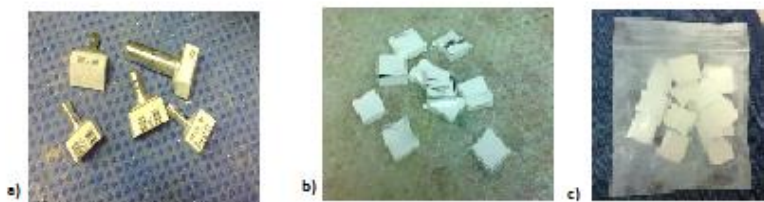


Figura 19 - a) Blocos de zircónia; b) representação das placas após o corte; c) representação das placas de zircónia depois de polidas e finalizada

Antes de cada ensaio das placas foram polidas com lixas de granulometria 600, 800, 1000 e 1200, respetivamente.

3.2 Caracterização das superfícies por perfilometria e rugosidade

Terminada a fase de preparação dos materiais, procedeu-se à caracterização dos mesmos. Para tal, utilizaram-se as técnicas de perfilometria para determinar o raio de curvatura das cúspides e a rugosidade para caracterizar as placas.

Os ensaios de perfilometria das cúspides foram realizados no perfilómetro, (*Contracer CP.200* da Mitutoyo) após calibração inicial da máquina para XMag:2, ZMag:20 e $v=0.2$ mm/s.

A medição da rugosidade foi efetuada após calibração do rugosímetro portátil (Mitutoyo Surftest-301) cujos parâmetros de avaliação foram o R_a , R_z e R_p .

- **Determinação do raio de curvatura das cúspides e da tensão de contacto**

A partir dos resultados da perfilometria, o raio de curvatura foi calculado com o auxílio da seguinte equação (1).

$$R = \frac{h}{2} + \left(\frac{w}{2}\right)^2 \times \frac{1}{2 \times h} \quad (1)$$

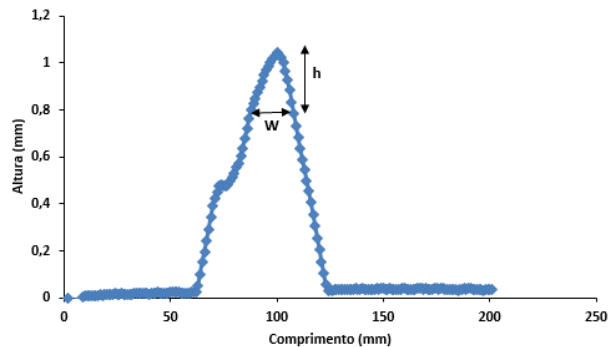


Figura 20 - Representação gráfica das siglas da equação

Procedeu-se, de seguida, aos cálculos da tensão de contacto através da equação de Hertz, em a é a área dado pela equação (2), o E que corresponde ao módulo de Young dado pela equação (3) e a tensão de contacto é calculada pela equação (4).

$$a = \left(\frac{3Wr}{4E} \right)^{1/2} \quad (2)$$

$$\frac{1}{E} = \frac{(1 - \nu^2)}{E_1} + \frac{(1 - \nu^2)}{E_2} \quad (3)$$

$$\sigma = \frac{W}{\pi \times a^2} \quad (4)$$

Onde os valores das constantes encontram-se apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Valor das constantes apresentada as equações (2), (3) e (4)

<i>Constantes</i>	<i>Valores</i>
W	1,96 N
E	5,95x10 ¹⁰
1/E	1,68x10 ⁻¹¹
Zircónia E	2x10 ¹¹
Zircónia ν	0,2
Esmalte E	8x10 ¹⁰
Esmalte μ	0,2

3.3 Determinação dos perfis de crescimento

3.3.1. Preparação dos meios de cultura

- ***Brain Heart Infusion – BHI***

O BHI é um conhecido meio para a cultura de *Streptococcus salivarius*. Foi sempre utilizado o meio já completo, conforme instruções do rótulo (Himedia de ref. M210I-5006), e sempre meio líquido. Este foi esterilizado na autoclave, a uma temperatura de 121°C durante 15 minutos. Depois de esterilizado o meio foi reservado à temperatura ambiente, para arrefecimento, e guardado no frio até ser necessário. A sua manipulação foi sempre efetuada em condições de assépsia.

- ***Meio Saliva Artificial e meio Saliva Artificial com diferentes suplementos (Ureia, Glucose e Extrato de Carne)***

O meio de saliva artificial foi preparado de acordo com o descrito em (Roger P. 2011) e autoclavado a uma temperatura de 121°C durante 15 minutos.

Na preparação do meio de saliva artificial com suplementos estes foram todos, com exceção da glucose, adicionados logo no início. No caso da glucose foi preparada uma solução, com a concentração necessária, que foi filtrada (com um filtro de 0,20 µm (Sartorius Stedim Biotech 11407-47-ACN) num sistema de filtração a vácuo e posteriormente adicionada ao restante meio, sempre em condições de assépsia.

Os meios a diferentes valores de pH foram preparados a partir do meio a pH 7 por ajuste, com uma solução de HCl e/ou NaOH, ao pH desejado e posteriormente filtrados, duas vezes com um filtro de 0,20 µm (Sartorius Stedim Biotech 11407-47-ACN) num sistema de filtração a vácuo e em condições de assépsia.

3.3.2 Preparação do Inóculo

O inóculo foi preparado da seguinte forma:

- a) O material utilizado foi todo autoclavado (121°C, 15 minutos);
- b) A ativação do *Streptococcus salivarius* foi efetuada em agar de sangue e incubado a 37°C durante 5 h;
- c) Foi transferido um inóculo para BHI e incubado a 37°C durante 12/18 horas;
- d) Foi efetuado um novo inóculo para ser utilizado nos ensaios quando a sua Abs₆₀₀=0,6.

3.3.3 Curvas de crescimento

As curvas de crescimento foram efetuadas em três meios diferentes sendo eles:

- a) BHI
- b) Saliva artificial
- c) Saliva artificial suplementada com glucose, ureia, extrato de carne.

As curvas foram efetuadas por incubação do respetivo inóculo, a 37°C, sem agitação, e efetuadas leituras a 600 nm. Para as curvas de crescimento, realizadas durante 9 horas, as leituras foram feitas aos 10 min., aos 20 min. e depois de 30 em 30 min.

As curvas efetuadas aos diferentes pH's estão resumidamente apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Variação do pH para as diferentes curvas

<i>Meio</i>	<i>pH</i>							
	3	4	5	6	7	8	9	10
BHI	X	X	X	X	X	X	X	X
SA					X			
SA + Glucose				X	X	X	X	
SA + Ureia					X			
SA + extrato de carne					X			
SA + glucose + Zircónia				X	X	X		
SA + glucose + Dente				X	X	X		

3.3.4. Preparação das amostras para o MEV

O procedimento de preparação das amostras para o MEV foi o seguinte:

- Preparação do inóculo segundo o procedimento descrito na secção 3.3.3;
- Imersão das placas de zircónia e dos dentes no inóculo durante 2 dias e 6 horas;
- Fixação em glutaraldeído a 4°C, durante 24 h;
- Lavagens sucessivas com etanol com concentrações a 50%, 70%, 90% e 100%, durante 10 minutos em cada concentração.

3.4 Ensaios tribológicos

Os ensaios de desgaste do tipo pino-placa foram realizados com movimento recíproco, com o auxílio de um protótipo desenvolvido na ESTetúbal em que os pinos foram as cúspides e as placas a zircónia, previamente preparados de acordo com a secção 3.1 (Figura 21).

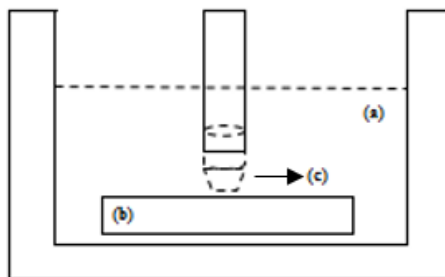


Figura 21 - Representação esquemática do protótipo da máquina de desgaste: (a) solução, (b) placa zircónia, e (c) cúspide dente molar

No decorrer do ensaio a força de atrito, que é obtida com o auxílio dos extensómetros que compõem a célula de carga, foi monitorizada e os valores recolhidos a cada 15 minutos.

As condições operacionais dos ensaios de desgaste encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4 - Condições operacionais dos testes de desgaste

Carga aplicada	2N
Frequência	1Hz
Temperatura	37°C
Duração	6h

Foram realizados 6 ensaios em cada um dos seguintes lubrificantes:

- Solução de saliva artificial
- Solução de saliva artificial suplementada com glucose
- Solução de saliva artificial suplementada com glucose e *Streptococcus salivarius*.

Antes dos ensaios de desgaste foi calculado o raio de curvatura das cúspides, de acordo com o procedimento descrito na secção 3.2, e as superfícies analisadas

por microscopia ótica e microscopia eletrónica de varrimento (MEV).

As amostras preparadas para o MEV, de acordo com a secção 3.3.4, foram ainda revestidas de ouro para facilitar a visualização.

As áreas desgastadas das cúspides foram avaliadas através de uma técnica designada por estereografia. Esta técnica tem como método transpor as imagens para o papel e através do seu peso chega-se aos valores de área desgastada.

Capítulo 4

Resultados experimentais

Microbiologia

4.1 Caracterização do microrganismo em estudo - *Streptococcus salivarius*

O *Streptococcus salivarius* foi o microrganismo escolhido para este estudo como sendo representativo da flora bucal.

Neste sentido procedeu-se, em primeiro lugar, à determinação do seu perfil de crescimento num meio standard, o meio Brain Heart Infusion (BHI) a pH 7, para posteriormente se validar a escolha de um meio de saliva artificial, por forma a simular as condições fisiológicas da cavidade oral.

I. Em meio standard BHI

A curva de crescimento do *Streptococcus salivarius* em BHI a pH 7 é apresentada na Figura 22. É uma curva típica de crescimento (Apêndice 3) que revela um crescimento rápido.

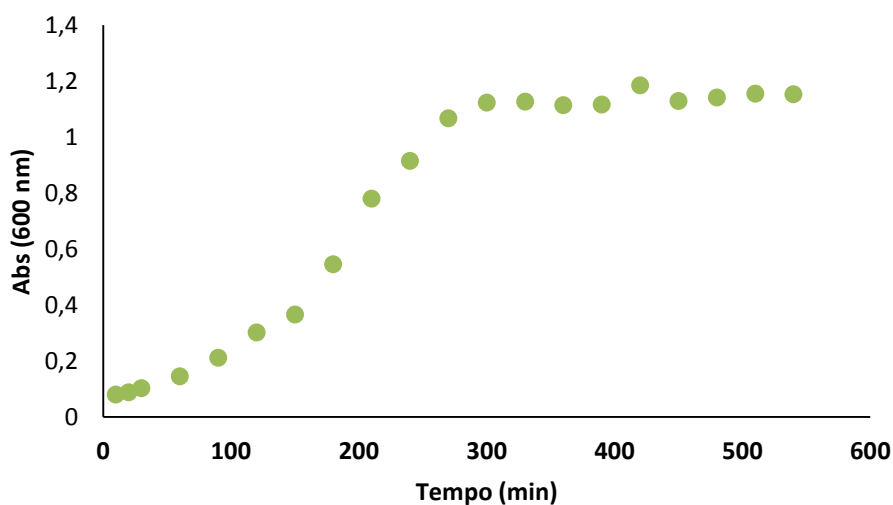


Figura 22 - Curva de crescimento do *Streptococcus salivarius* em meio BHI a pH 7

Caracteriza-se por uma fase lag muito breve (ou mesmo inexistente) após a qual as células crescem a uma velocidade exponencial até aos 300 min., momento em que se atinge a fase estacionária.

- **Efeito do pH**

Foi igualmente estudado o efeito do pH no crescimento do *Streptococcus salivarius* (Figura 23).

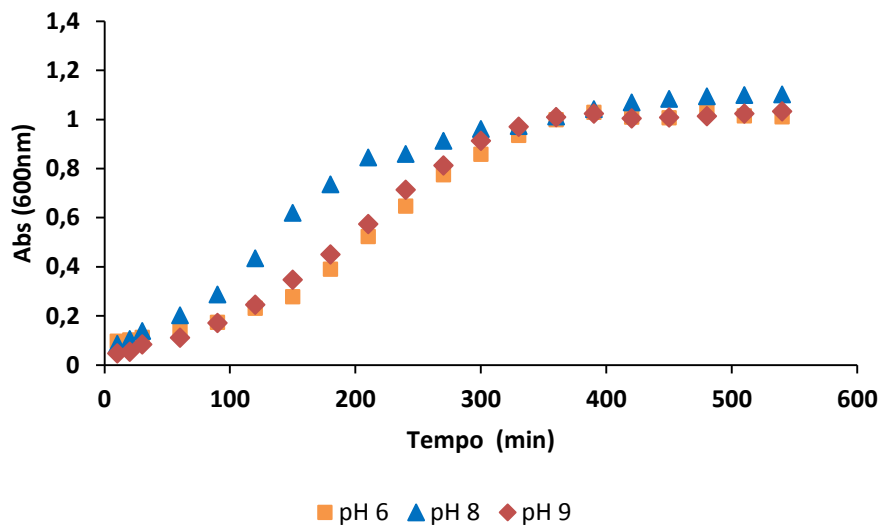


Figura 23 - Curva de crescimento do *Streptococcus salivarius* em BHI a diferentes pH's

Para uma melhor visualização do pH ótimo, selecionou-se o tempo $t = 300$ min. e efetuou-se a representação da Abs_{600} vs pH (Figura 24), constatando-se que o pH 7 é o ótimo.

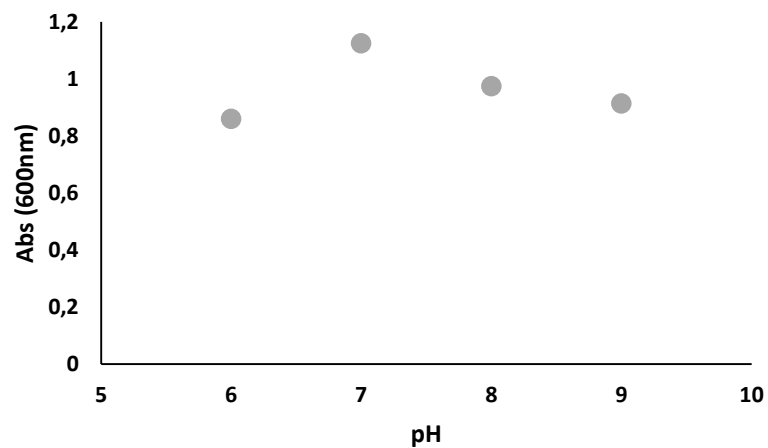


Figura 24 – Determinação do pH ótimo em BHI

II. Em Meio Saliva Artificial

Foi igualmente efetuada a curva de crescimento do *Streptococcus salivarius* em saliva artificial a pH 7 (Figura 25).

A curva apresenta o andamento característico e após uma fase lag curta (cerca de 100 min.) segue-se a fase exponencial até aos 390 min., momento em que se atinge a fase estacionária.

Comparativamente com a curva obtida anteriormente, em BHI a pH 7, o crescimento revela-se mais lento para além de crescer menos. Contudo foi possível confirmar que o meio de saliva artificial suporta o crescimento do *Streptococcus salivarius*.

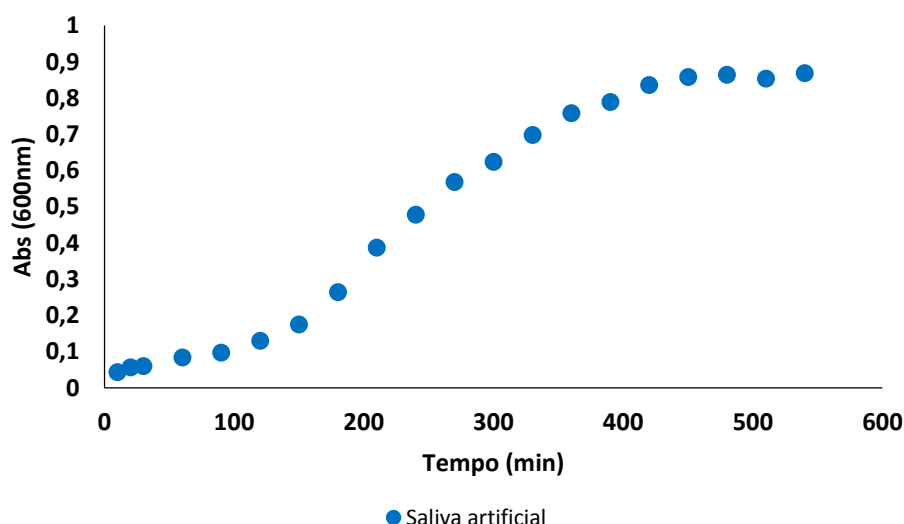


Figura 25 - Curva de crescimento do *Streptococcus salivarius* em saliva artificial a pH 7

Contudo, e apesar de suportar o crescimento, o meio de saliva artificial não é, só por si, representativo de uma refeição. Desta forma o meio de saliva foi suplementado com: glucose, extrato de carne e ureia e tal como anteriormente foram efetuadas as curvas de crescimento do *Streptococcus salivarius* a pH 7 (Figura 26).

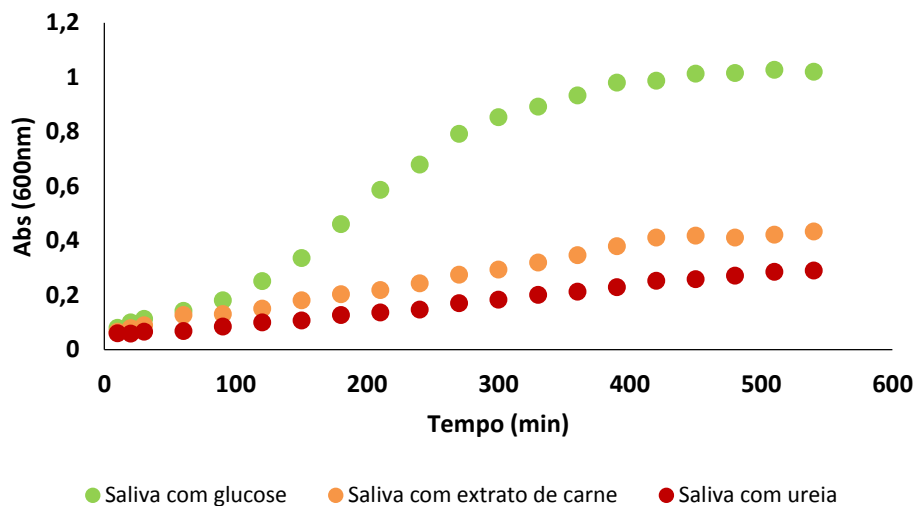


Figura 26 - Curva de crescimento do *Streptococcus salivarius* nas diferentes salivas suplementadas

Para determinação das condições ótimas, selecionou-se o tempo $t = 390$ min. e efetuou-se a representação da Abs_{600} vs composição (Figura 27).

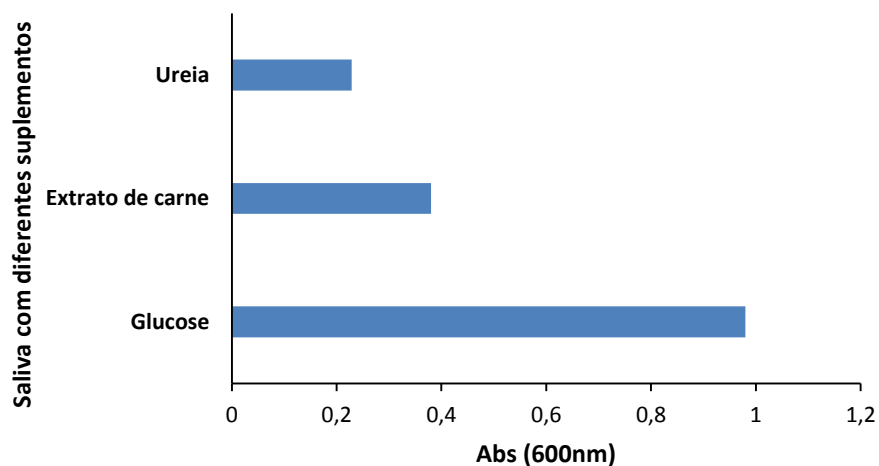


Figura 27 - Representação gráfica da Abs_{600} vs composição das diferentes salivas

Pode-se assim concluir que o meio saliva artificial suplementada com glucose a pH 7 é o meio fisiológico ótimo de crescimento do *Streptococcus salivarius*.

4.2. Caracterização do *Streptococcus salivarius* em condições fisiológicas de Saliva artificial suplementada com Glucose

- Efeito do pH

O pH é um fator decisivo no crescimento dos microrganismos e dele depende também a integridade do biofilme formado na cavidade bucal. Assim analisou-se o efeito do pH no crescimento do *Streptococcus salivarius* (Figura 28).

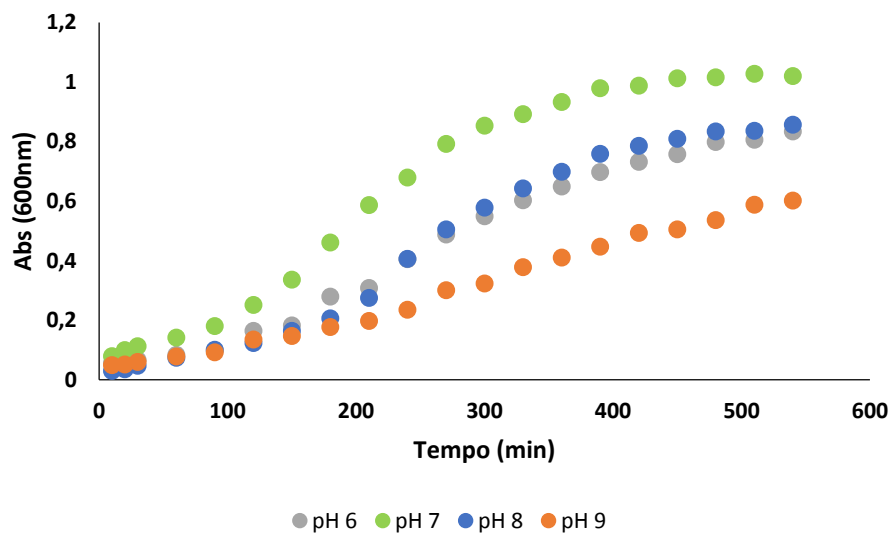


Figura 28 - Curva de crescimento em saliva artificial suplementada com glucose a diferentes valores de pH

Para uma melhor visualização do pH ótimo, selecionou-se o tempo $t = 390$ min. e efetuou-se a representação da Abs₆₀₀ vs tempo registrando-se que o pH 7 é o pH ótimo (Figura 29).

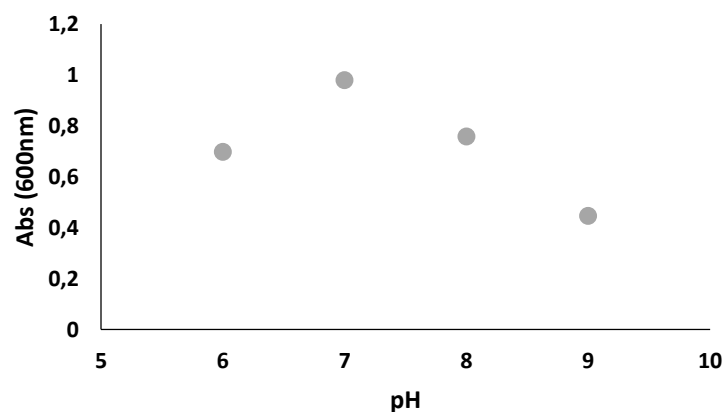


Figura 29 - Determinação do pH ótimo em saliva artificial suplementada com glucose

Por forma a verificar de que forma os materiais (zircónia e dente) afetavam o crescimento do *Streptococcus salivarius* foram efetuadas as respetivas curvas de crescimento realizando-se em simultâneo, no caso da zircónia, o estudo do efeito do pH.

- **Efeito na presença de Zircónia**

A curva de crescimento do *Streptococcus salivarius*, em saliva suplementada com glucose, para diferentes valores de pH e na presença de zircónia é apresentada na Figura 30.

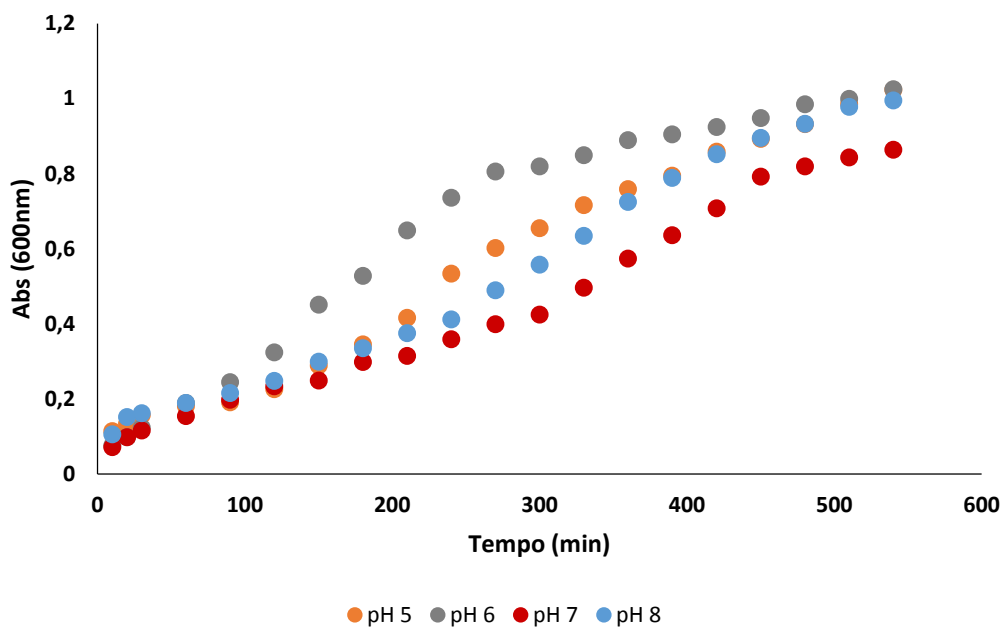


Figura 30 - Curva de crescimento do *Streptococcus salivarius* na presença de zircónia a diferentes pH's

A curva de crescimento não é uma curva típica sendo contudo possível registar um crescimento mais lento com uma fase exponencial mais prolongada alcançando-se a fase estacionária sensivelmente aos 500 min.

Este estudo revela igualmente que houve um decréscimo no pH ótimo, uma diminuição, de pH 7 para pH 6, na presença da zircónia.

- **Efeito na presença do dente**

Neste caso foi apenas efetuada a curva de crescimento para pH 7, dado ser este o pH com mais relevância (Figura 31).

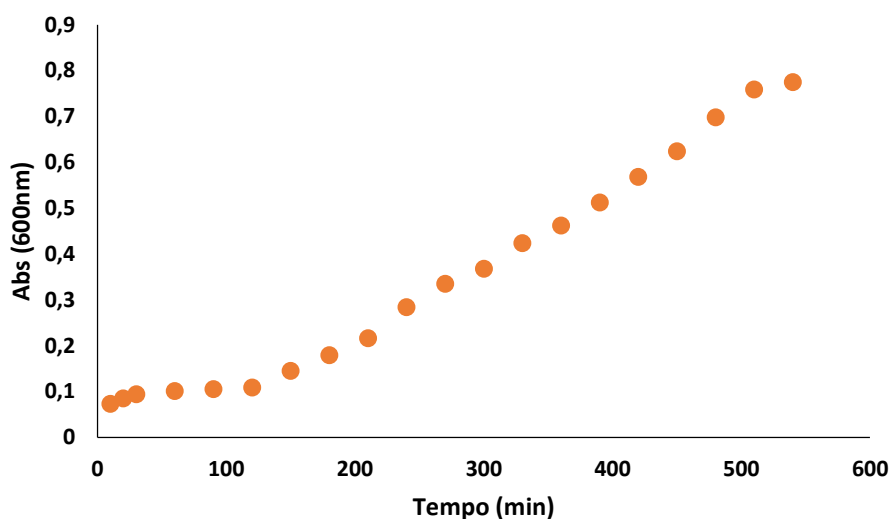


Figura 31 - Curva de crescimento em condições fisiológica na presença do dente

4.3 Impacto do material no crescimento do *Streptococcus Salivarius*

Efetuada as curvas de crescimento do *Streptococcus salivarius*, na ausência e na presença de material, foi possível constatar que o tipo de material influencia o crescimento, sendo que a zircónia favorece ligeiramente o crescimento comparativamente com o dente (Figura 32).

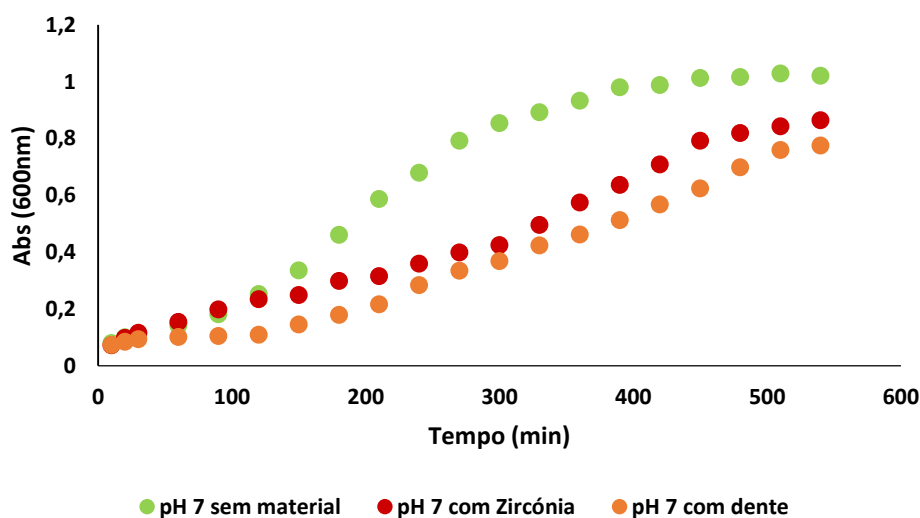


Figura 32 – Impacto do material (zircónia e dente) no crescimento do *Streptococcus salivarius*.

4.4 Imagens MEV

Concluídas todas as etapas no estudo do crescimento do *Streptococcus salivarius*, procedeu-se à observação das placas de zircónia no MEV com o intuito de se visualizar o biofilme que se tinha formado.

Assim na Figura 33 encontra-se representado imagens do biofilme em meio standard BHI e em saliva suplementada com glucose que foi o meio utilizado para o estudo.

As imagens mostram que no meio standard de BHI existe maior concentração de *Streptococcus salivarius* do que no meio de saliva artificial suplementada.

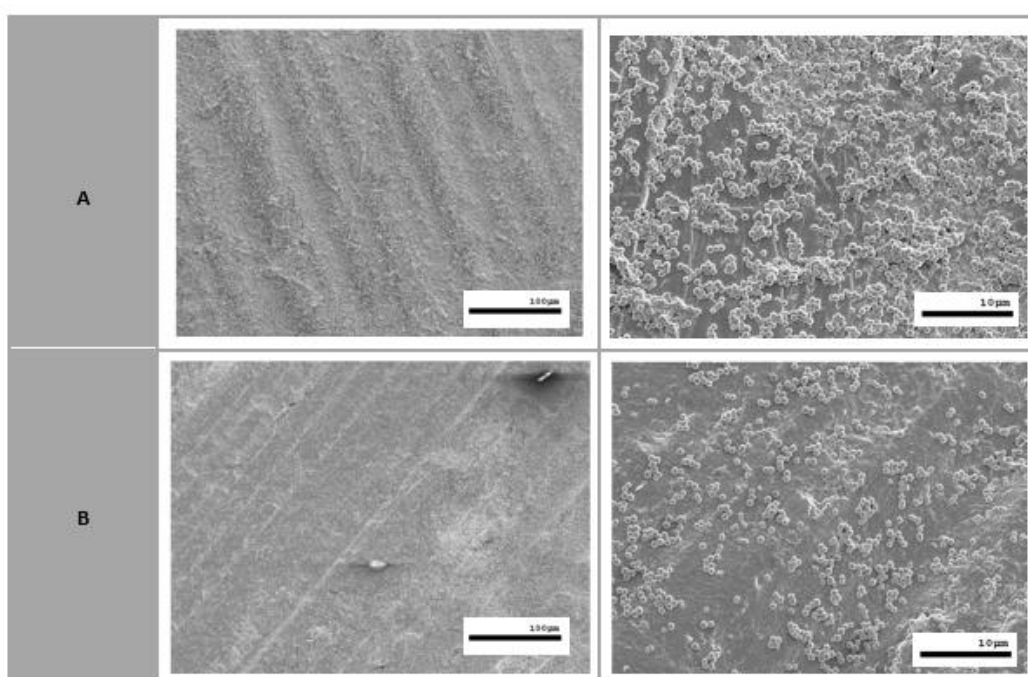


Figura 33 - Imagens MEV do biofilme durante 54 horas de incubação a pH 7 em meio standard BHI (A) e em saliva suplementada com glucose (B)

Materiais e desgaste

4.5 Determinação do raio de curvatura e da Tensão de contacto

O raio de curvatura foi determinado de acordo com o descrito na secção 3.2. Os resultados mostram que o raio de curvatura apresenta um valor médio de 0,001 m, este valor está de acordo com o referenciado em (Figueiredo-Pina 2013)- No caso da tensão de contacto a média dos valores de tensão é 1037,26 MPa.

Após a obtenção do raio de contacto, as cúspides foram agrupadas em 3 grupos. Cada grupo é composto por seis cúspides, onde cada cúspide foi numerada segundo o descrito na secção 3.1 a preparação das cúspides. Estas foram agrupadas para que os valores de tensão e o raio de contacto fossem semelhantes, entre grupos (Tabela 5)

Tabela 5 - Composição dos grupos para os testes de desgaste

Saliva Artificial						
Cúspides	5e	1c	1d	3b	5b	1e
Raio de Curvatura (m)	0,0001	0,0001	0,0011	0,0011	0,0004	0,0005
Tensão de contacto (MPa)	2825	2704	674	690	1300	1223
Saliva Artificial Suplementada						
Cúspides	1a	2d	3c	1b	5a	6c
Raio de Curvatura (m)	0,0004	0,0003	0,0006	0,0007	0,0004	0,0008
Tensão de contacto (MPa)	1431	1560	1031	910	1482	849
Saliva Artificial Suplementada + Streptococcus Salivarius						
Cúspides	3a	2c	4d	2a	6a	4c
Raio de Curvatura (m)	0,0005	0,0005	0,0016	0,0015	0,0010	0,0011
Tensão de contacto (MPa)	1140	1165	543	562	718	679

4.6 Rugosidade

Na determinação da rugosidade (secção 3.2), obtiveram-se os seguintes valores e respetivos desvios padrão. Para o Ra $1,64 \mu\text{m} \pm 0,538 \mu\text{m}$ e para o Rz $10 \mu\text{m} \pm 3,478 \mu\text{m}$

Esta informação é de extrema importância para o biofilme, pois é com estes valores permitirão identificar os pontos de ancoramento das bactérias.

4.7 Desgaste

4.7.1 Coeficiente de atrito

Na Figura 34 encontram-se os valores dos coeficientes de atrito, calculados de acordo com o descrito na secção 3.4

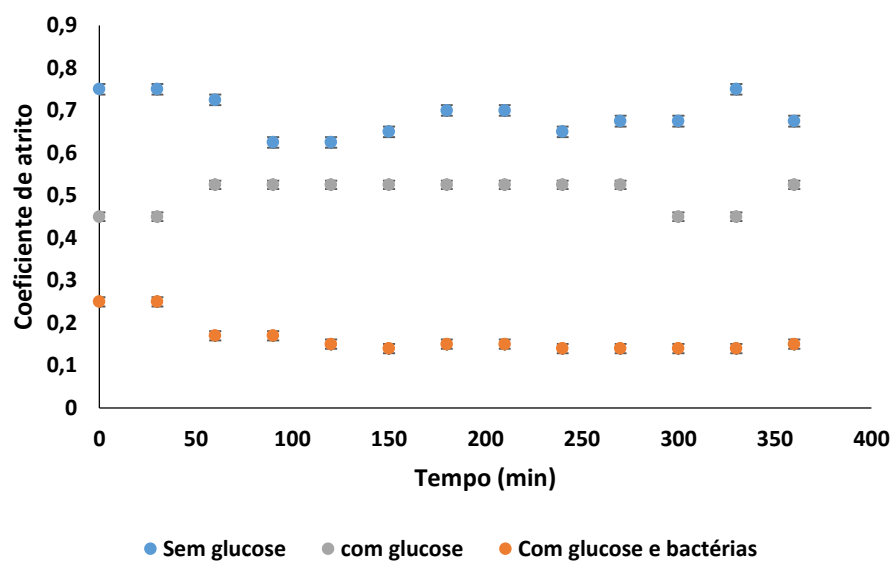


Figura 34 - Representação gráfica do coeficiente de atrito para as diferentes condições

A monitorização do coeficiente de atrito, ao longo dos ensaios, mostrou que este é mais elevado em saliva sem glucose (aprox. 0,7) e menor na presença de *Streptococcus salivarius* (aprox.0,2).

4.7.2 Área de desgaste das cúspides

Na Figura 35 encontra-se representado os valores das áreas desgastada, obtidos de acordo com o descrito na secção 3.4.

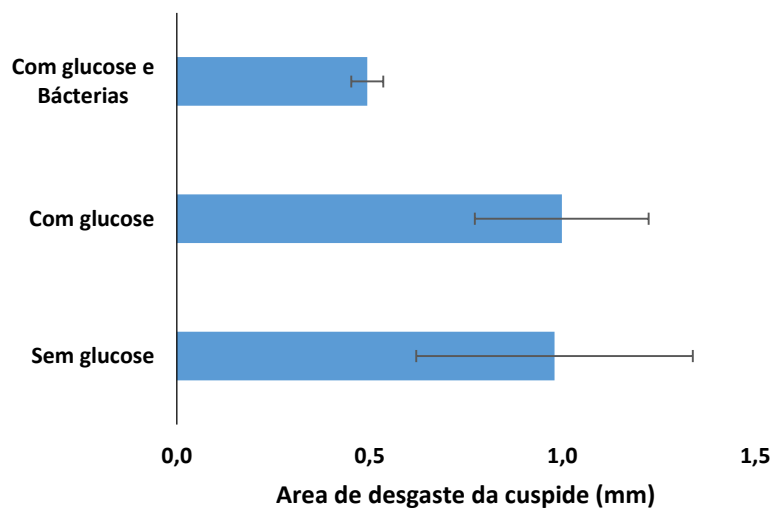


Figura 35 - Representação gráfica das áreas desgastadas nos diferentes lubrificantes utilizados

Analisando a Figura 35, é possível constatar uma redução de 50% da mesma na presença de *Streptococcus salivarius*, comparativamente com os outros lubrificantes utilizados. Concluindo-se que o biofilme influencia o desgaste, diminuindo-o.

Por fim procedeu-se à observação das cúspides ao microscópio óptico e no MEV (Figura 36).

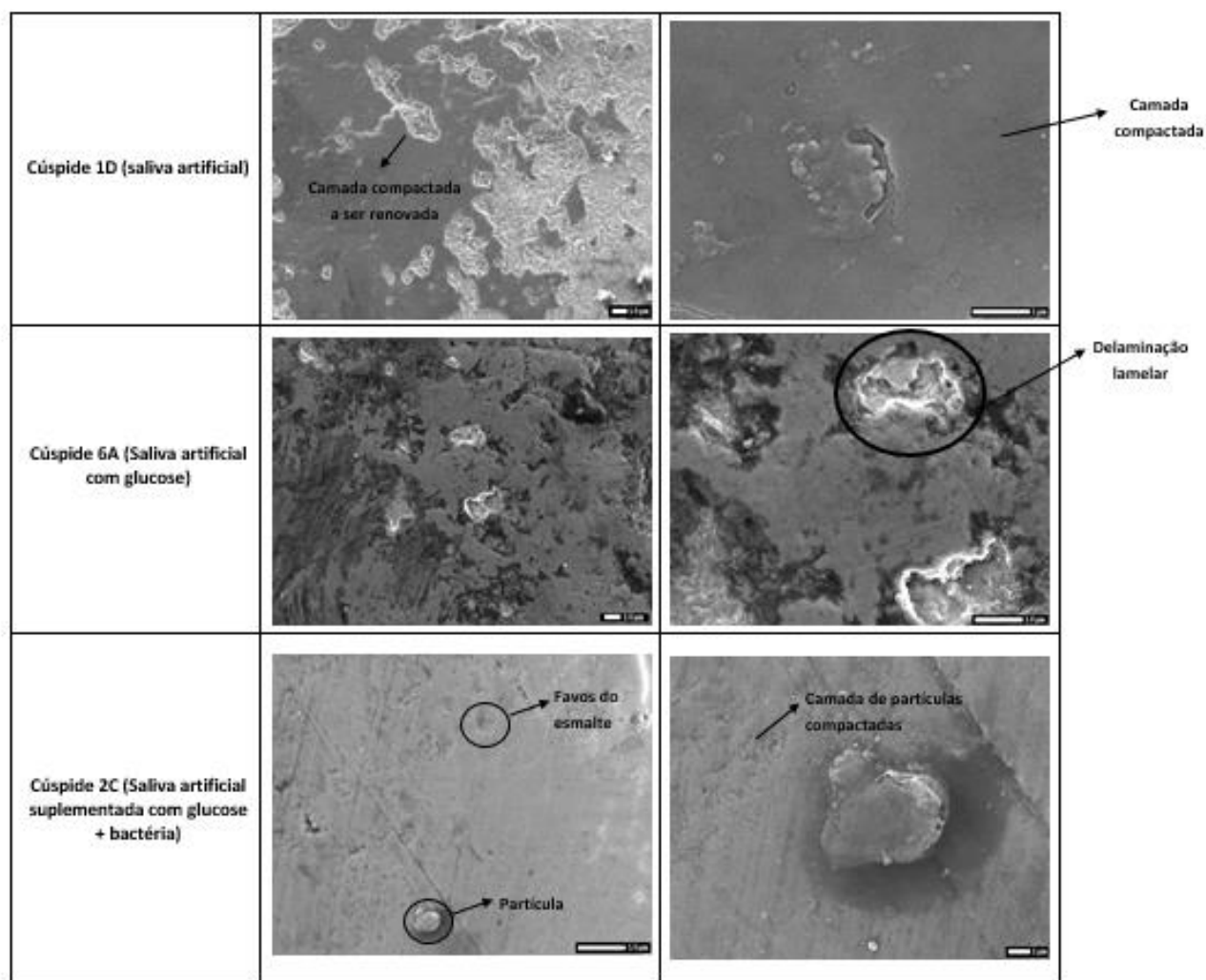


Figura 36 - Imagens de MEV das pistas de desgaste nos três diferentes meios

Através da visualização das imagens em MEV, verifica-se que na cúspide 2C, ou seja, na presença do *Streptococcus salivarius*, o desgaste é reduzido, pois é possível observar a estrutura em favo do esmalte.

Capítulo 5

Discussão

A presente tese teve como objetivo explorar a influência do biofilme no desgaste de materiais odontológicos, mais especificamente no par tribológico dente/zircônia. Durante a pesquisa bibliográfica, não foram encontrados estudos que abordem esta temática, sendo este tema inovador e ainda pouco estudado. Esta situação torna o estudo relevante dado que normalmente os testes de desgaste, realizados na presença de material biológico, não são executados em condições de assépsia. A ausência de assépsia aliada ao facto dos testes serem realizados a 37°C é a condição ótima para o desenvolvimento de bactérias, nomeadamente das bactérias comensais, como é o caso do *Streptococcus salivarius*. Este crescimento foi verificado por realização de um teste de desgaste inicial, experimental, em saliva artificial sem suplemento, após o qual se procedeu à filtração e cultivo em meio nutritivo, tendo-se verificado crescimento bacteriano. Estudos de Brandt referem a existência de várias espécies de bactérias no lubrificante após ensaios de simulação da prótese do joelho e da anca (Brandt J. 2011).

A bactéria selecionada foi o *Streptococcus salivarius* dada a sua relevância e predominância na cavidade oral, relativamente a outros *Streptococcus* presentes, como referenciado em (Amoroso P. 2003).

As condições de realização dos testes de desgaste foram determinadas pelas condições ótimas de crescimento da bactéria selecionada. Para tal procedeu-se ao estudo do *Streptococcus salivarius* efetuando-se as curvas de crescimento, em meio standard BHI, em saliva artificial e saliva artificial suplementada com: glucose, ureia e extrato de carne, respetivamente. Muito embora a saliva artificial sustentasse o crescimento, pois as curvas de crescimento em saliva e em BHI são equivalentes (Figura 22), este meio não era representativo de uma refeição. Neste sentido efetuaram-se as curvas de crescimento em várias salivas suplementadas verificando-se que a saliva suplementada com glucose era o meio ótimo de crescimento para o *Streptococcus salivarius* (Figura 26). Procedeu-se igualmente ao estudo do crescimento do *Streptococcus salivarius* na presença do dente e da zircônia, para pesquisar se e de que forma o material influenciava o crescimento.

Verificou-se que existe uma ligeira diminuição do crescimento (Figura 32), que se reflete não só na sua concentração (a quantidade obtida no final é menor) mas na taxa de crescimento que é mais lenta (uma fase exponencial mais prolongada). É na fase estacionária que as células passam de planctónicas a sésseis sendo estas as responsáveis pela formação do biofilme. Estes resultados sugerem que na presença de material as células planctónicas levam mais tempo a tornarem-se sésseis e a formarem o biofilme (Costa J. 2014). Através das imagens de MEV é possível visualizar a formação do biofilme nas placas de zircónia após 54 horas de incubação quer em BHI quer em saliva artificial suplementada com glucose (Figura 33).

O estudo efetuado, na presente tese, mostra que a saliva artificial influencia o crescimento do *Streptococcus salivarius*. Tal como mostra a Figura 26 o meio ótimo de crescimento é a saliva artificial suplementada com glucose.

O estudo do efeito do pH no crescimento revela o já esperado para uma bactéria comensal, o pH ótimo é o pH 7, quer na ausência quer na presença de glucose. É de salientar que a saliva humana apresenta uma gama de pH ente 6,2 a 7,6. Assim o pH ótimo encontrado está dentro da gama de pH da saliva fisiológica (Aps J. K. 2005, Almeida P. 2008). Regista-se contudo, apenas na presença de zircónia, uma ligeira diminuição do pH ótimo (Figura 30), para pH 6.

Determinadas as condições ótimas relativas à componente microbiana foram efetuados os testes de desgastes. O modelo de desgaste utilizado é um modelo simples do tipo pino-sobre-placa com movimento recíproco extensivamente usado no estudo de fundamentos da tribologia, como é o caso (Figueiredo-Pina 2013). Nos testes efetuados utilizaram-se como lubrificantes: a saliva artificial, sem e com suplemento, e a saliva suplementada com glucose e *Streptococcus salivarius* a 37°C com um pH 7.

A rugosidade das placas de zircónia está dentro dos valores que favorecem o crescimento bacteriano (Bollen C. 1997). Apresentam uma rugosidade média (Ra) de 1,64 µm. Este valor é bastante relevante para o processo de adesão de bactérias. Alguns estudos *in vivo* afirmam a existência de um limite de rugosidade para a adesão bacteriana, sendo esse valor de 0,2 µm. Ou seja, o Ra tem de ser igual ou superior a este valor limite. Quanto mais elevado o Ra, maior é a adesão bacteriana e maior a formação de placa bacteriana (Bollen C. 1997). Posto isto, é possível constatar que segundo (Bollen C. 1997, Assis F. 2014) o Ra encontra-se acima do valor mínimo para a otimização do crescimento bacteriano, o que para o estudo em

questão foi bastante relevante.

A perfilometria permitiu o cálculo do raio de curvatura das cúspides que apresentou um valor médio de 0,001 m, tal como referenciado em (Figueiredo-Pina 2013). Já a tensão de contacto apresentou um valor médio de tensão de 1037,26 Mpa. Estes valores foram relevantes para agrupar as cúspides para os ensaios de desgaste tornando os resultados finais mais fiáveis.

O coeficiente de atrito (Figura 34) é influenciado pela presença do biofilme. Os ensaios efetuados mostram que o coeficiente de atrito é mais elevado em saliva sem glucose (aprox. 0,7) e menor em saliva com glucose, na presença de *Streptococcus salivarius* (aprox.0,2). Esta diminuição significativa deve-se, possivelmente, à adsorção da glucose na superfície da zircónia ou do dente, bem como ao poder lubrificante do biofilme. O valor obtido para a saliva sem glucose está em concordância com os valores presentes na literatura (Figueiredo-Pina 2013).

Relativamente à área desgastada esta não foi influenciada pela geometria das cúspides como é possível ver na Figura 37.

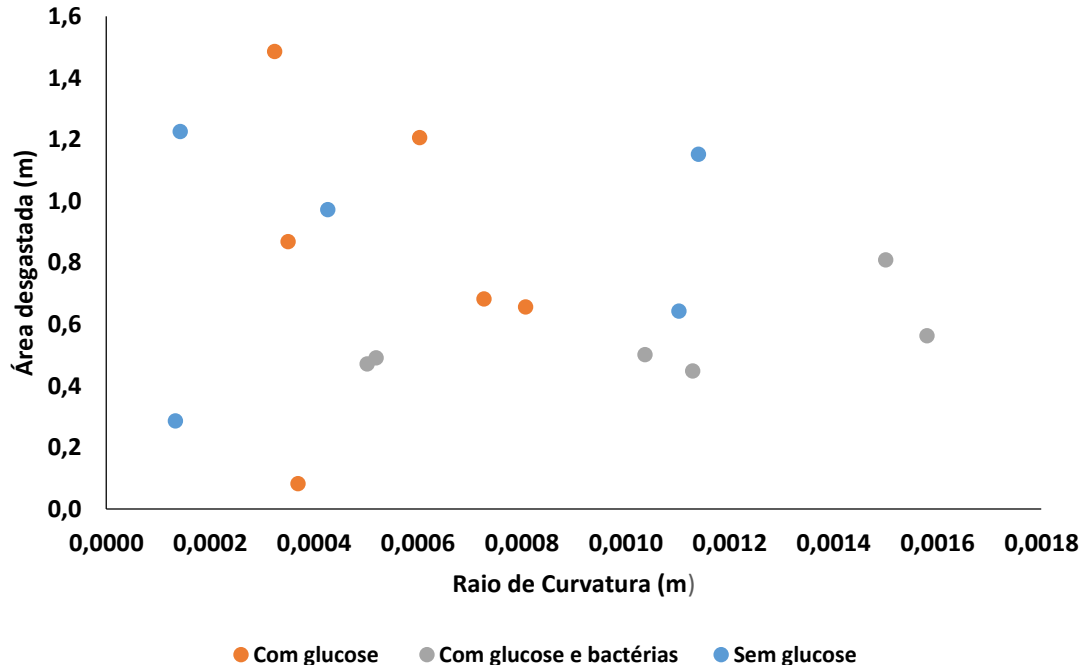


Figura 37 - Representação gráfica da relação área desgastada vs raio de curvatura

A existência do biofilme conduz a uma redução significativa do desgaste dentário. Na Figura 35 é possível analisar que a saliva artificial suplementada com glucose apresenta a maior área de desgaste, apresentando uma média de 1 mm².

Contudo, a saliva suplementada com glucose na presença de bactérias apresenta o desgaste mais baixo com cerca de $0,49 \text{ mm}^2$, ou seja, constata-se uma redução de 50% na presença de *Streptococcus salivarius* comparativamente com os outros lubrificantes utilizados concluindo-se que o biofilme também leva a redução do desgaste. Estes resultados sugerem que o biofilme vai desempenhar um papel protetor da superfície do dente reduzindo o seu contacto com a superfície antagonista. Especula-se que as bactérias juntamente com as partículas formam um lubrificante sólido o que leva a diminuição do atrito e à proteção da superfície conduzindo a um menor desgaste (Figura 36).

No final dos testes de desgaste as cúspides foram observadas ao microscópio óptico e em MEV, sendo possível verificar que cada pista de desgaste apresenta uma topografia diferente. Alguns riscos nas superfícies e algumas cúspides apresentam predominantemente delaminação adesiva como mostra a Figura 36.

Através da análise das imagens MEV (Figura 36), é possível observar que existe uma camada compacta sobre o dente. Sendo esta constituída por partículas nanométricas. Por outro lado, é possível observar-se arrancamento lamelar da camada. De facto, o esmalte é constituído por cristais nanométricos de hidroxiapatite que apresentam uma espessura e largura de cerca de 30 nm e 60 nm respetivamente com comprimentos que variam entre os 100 a 500 nm (Lewis R. 2005). Dado isto, propõem-se o seguinte modelo de desgaste e cuja representação esquemática é dada na Figura 38:

1. Devido ao contacto entre as duas superfícies existe desgaste predominantemente do dente o que resulta na formação de partículas de desgaste de tamanho nanométrico;
2. As partículas de desgaste são atraídas para a superfície do dente;
3. Devido à ação mecânica e ou química, as partículas são compactadas formando uma camada compacta. Neste processo de compactação poderá existir material orgânico quando os microrganismos estão presente;
4. Devido às solicitações cíclicas existe delaminação da camada por um processo de fadiga de superfícies conduzindo à formação de partículas de forma lamelar. Pela análise do MEV pensa-se que a formação da fissura dá-se na interface entre o dente e a cama compacta.

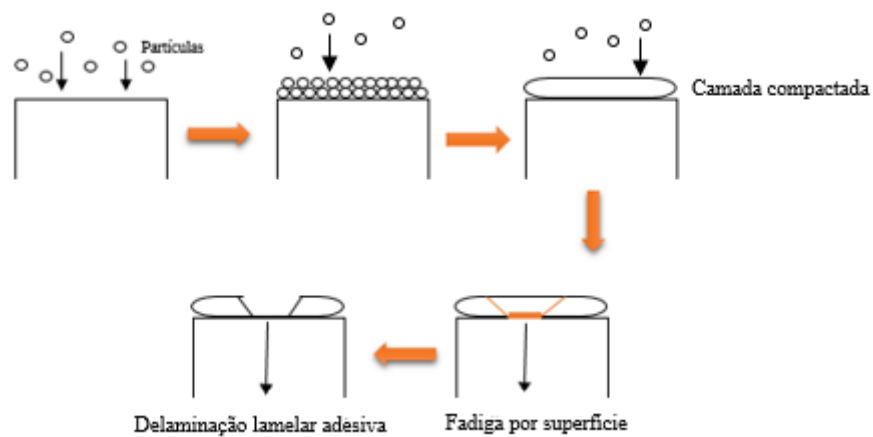


Figura 38 - Representação esquemática do que é observado nas imagens de MEV

De forma geral, os ensaios tribológicos mostram que a presença de bactérias influencia os resultados tribológicos o que poderá dever-se ao poder lubrificante da presença de material orgânico.

Conclusão

O principal objetivo desta tese visou o estudo da influência do biofilme no desgaste dentário, para tal foi selecionada a bactéria *Streptococcus salivarius* e as suas condições de crescimento estudadas. Em seguida, foram realizados ensaios tribológicos com saliva artificial, saliva artificial suplementada com glucose e saliva artificial suplementada com glucose e bactérias.

Após finalização do mesmo é possível chegar às seguintes conclusões:

- O meio influencia o crescimento do *Streptococcus salivarius*, sendo que o meio ótimo de crescimento é a saliva artificial suplementada com glucose;
- O pH influencia o crescimento do *Streptococcus salivarius*, onde o pH ótimo é o pH 7;
- A presença de material influencia o crescimento do *Streptococcus salivarius*, diminuindo o seu crescimento e retardando assim a fase estacionária;
- A rugosidade das placas de zircónia encontra-se dentro dos valores que favorecem o crescimento bacteriano, ou seja, o (Ra) médio é de 1,64 μm o que significa que se encontra acima do valor mínimo para a otimização do crescimento bacteriano sendo esse valor 0,2 μm ;
- O Raio de curvatura apresenta um valor medio de 0,001m;
- O coeficiente de atrito é influenciado pela presença do biofilme, o que conduz a sua diminuição
- A área desgastada é influenciada pelo biofilme, a presença do biofilme conduz a uma redução de cerca de 50% da área desgastada.
- Pelas áreas de desgaste observadas no MEV e no microscópio óptico é possível observar a prevalência de desgaste abrasivo e de delaminação;

De forma geral pode-se concluir que a existência de *Streptococcus salivarius* no par tribológico dente/zircónia conduz a uma redução do atrito e do desgaste.

Desenvolvimentos Futuros

Considerando a experiência no decorrer do presente trabalho e no sentido de otimizar as condições futuras poder-se-ia propor alguns trabalhos futuros, tais como:

- Analisar a influência do biofilme no desgaste dentário com outros materiais odontológicos;
- Analisar a influência da variação do pH no decorrer dos ensaios tribológicos;
- Utilizar a microflora bucal para um novo estudo comparativo.

Bibliografia

Aguiar S. (2011). ""Processos de corrosão em materiais de aplicação biomédica e crescimento bacteriano em salivas artificiais"." Universidade de Lisboa; Faculdade de Ciência.

Almeida P., G. A., Mahado M. (2008). "Saliva composition and functions: A comprehensive review." J Contemporay Dent Prac 9(3): 072-080.

Amoroso P., Á. F., Gagliardi C. (2003). "Prevalence of different streptococci species in the oral cavity of children and adolescents." Braz J Oral Sci 2.

Andreiuolo R., A. S., Dias K. (2011). ""A zircônia na Odontologia Restauradora"." Revista Brasileira de Odontologia; Rio de Janeiro 68: 49-53.

Aps J. K., M. L. (2005). ""Review: The physiology of saliva and transfer of drug into saliva"." (150): 119-131.

Assis F., C. J. (2014). "Influência dos métodos de esterelização, óxido de etileno e radiação gama, nas características físico-químicas de dois materiais abutments de implantes, titânio e zircônia." Faculdade de Odontologia; Brasil.

Bollen C., L. P., Quirynen M. (1997). "Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: A review of the literature." Dent Mater(13): 258-269.

Bossolan N. (2002). "Introdução à microbiologia." Universidade de São Paulo.

Brooks J., C. K., Butel J., Morse S. (2007). "Medical Microbiology." Mc Graw Hill.
Campos A. (2012). "AVALIAÇÃO CLÍNICA E RADIOGRÁFICA DE IMPLANTES DE ZIRCÔNIA E TITÂNIO INSERIDOS EM REGIÃO POSTERIOR DA MANDIBULA: ACOMPANHAMENTO DE 12 MESES." Guarulhos.

Carvalho I. (2010). "Microbiologia Básica."

Chevalier J. (2006). "What future for zirconia as a biomaterial?" Biomaterials 27(4): 535-543.

Costa J., E. F., Pieri F., Carvalho I., Moreira M. (2014). "Perfil de sensibilidade de células sésseis e planctónicas de Escherichia coli a antimicrobianos usados no tratamento de mastite bovina." 66(1): 129-136.

DeLong R., A. K. (2002). "Factors affecting enamel and ceramic wear: a literature review." The Journal of Prosthetic Dentistry.

Denry I., H. J. (2010). "Ceramics for Dental Applications: A Review." Materials 3(1): 351-368.

Denry I., K. J. (2008). "State of the art of zirconia for dental applications." *Dent Mater* 24(3): 299-307.

Ferreira W., S. j. (1998). "Microbiologia." 1.

Figueiredo-Pina, C. G. (2013). "Effect of feldspar porcelain coating upon the wear behavior of zirconia dental crowns." *Wear* 297(1-2): 872-877.

Ghazal M., Y. B., Ludwig K., Kern M. (2008). "Two-body wear of resin and ceramic denture teeth in comparison to human enamel." *Dent Mater* 24(4): 502-507.

Horz H., M. A., Houben B. and G. Conrads (2007). ""Distribution and persistence of probiotic *Streptococcus salivarius* K12 in the human oral cavity as determined by real-time quantitative polymerase chain reaction"." *Oral Microbiology Immunology*(22): 126-130.

Kalin M., D. G., Novak S., Vižintin J. (2006). "Wear mechanisms associated with the lubrication of zirconia ceramics in various aqueous solutions." *Journal of the European Ceramic Society* 26(3): 223-232.

Kelly J., D. I. (2008). "Stabilized Zirconia as a structural ceramic: An overview." *Dental material*(24): 289-298.

Kim, M. J., S. H. Oh, J. H. Kim, S. W. Ju, D. G. Seo, S. H. Jun, J. S. Ahn and J. J. Ryu (2012). "Wear evaluation of the human enamel opposing different Y-TZP dental ceramics and other porcelains." *J Dent* 40(11): 979-988.

Lambrechts P., G. K., Bharadwaj D., De Munck J., Bergmans L., Peumans M., Van Meerbeek B. (2006). "Degradation of tooth structure and restorative materials: A review." *Wear* 261(9): 980-986.

Leung V., D. D. W. (1997). ""Artificial salivas for in vivo studies of dental materials"." *Journal of Dentistry* 25: 475-484.

Lewis R., D.-J. R. (2005). "Wear of human teeth: a tribological perspective." *Proceedings of the IMechE Part J Journal of Engineering Tribology* 219(1): 2-19.

Moraes M. (2004). "MICROESTRUTURA E PROPRIEDADES MECÂNICAS DE COMPÓSITOS ALUMINA-ZIRCÔNIA PARA PRÓTESES DENTÁRIAS." Rio de Janeiro.

Murray P., K. G., Rosenthak K., Pealler M. (1998). "Microbiologia Médica." Rio de Janeiro.

Nascimento J. (2009). "Introdução a Microbiologia." *Biologia de microorganismos*.

Oliveira A., S. J., Oliveira L., Souza L., Santana W. (2004). "Factores de virulência de *Neisseria* spp. ." *Arq. ciências saúde UNIPAR*: 39-44.

- Paço R., L. I., Bottino J., Ferreira A. (2003). "Identification of Lactobacillus spp." Brazil Journal Microbiology.
- Patterson M. (1996). "Medical Microbiology-Chapter 13 - Streptococcus." Texas University
- Piconi C., M. G. (1999). "Zirconia as a ceramic biomaterial." Biomaterials(20): 1-25.
- Pizzato M., C. V., Ribeiro R., Sartori I. (2011). ""Importância da placa reposicionadora oclusal (overlay) no planejamento das reabilitações orais"." Volume 05.
- Radi P., S. L., Bonetti L., Trava-Airolti V. (2007). "Tribologia, Conceitos e Aplicações." Instituto Tecnológico de Aeronáutica.
- Richard J., G. N., Howard F. (2006). "Oral Microbiology and Immunology." AMS Press.
- Roger P., D. J., Bouix M., Beal C. (2011). "Characterization of Streptococcus salivarius growth and maintenance in artificial saliva." J Appl Microbiol 111(3): 631-641.
- Romeiro R., R. F. (2010). "Etiology and treatment of periimplant illnesses."
- Ronald M. (1997). "Bacterial Growth and Reproduction."
- Santos A. (2010). "Microbiologia geral." Centro de ciência e tecnologia agroalimentar.
- Seeley R., P. T., James K. (2003). ""Anatomia e Fisiologia"." 6º edição.
- Seidl M. (2011). ""Uso de cerâmicas reforçada com zircônia em tratamento estético integrado"." Faculdade de Odontologia; Porto Alegre.
- Silva C. (2009). ""Estruturas cerâmicas a base de Zircônia e alumina utilizadas na confecção de infra-estruturas para coroas e pontes fixas" " Universidade Federal do Rio Grande do Norte Centro de Ciências Exatas e da Terra.
- Teixeira K., B. A., Cortés M. (2010). "Processos físico-químicos no biofilme dentário relacionados à produção da cárie."
- Velayos J., S. H. (2004). ""Anatomia da cabeça e pescoço"." 3º edição: 95-115.
- Wang L., L. Y., Si W., Feng H., Tao Y., Zhizuo M. (2012). "Friction and wear behaviors of dental ceramics against natural tooth enamel." Journal of the European Ceramic Society 32(11): 2599-2606.
- Xavier J., P. C., Almeida J., van loosdrecht M. (2002). "Monitorização e modelação de estrutura de biofilmes."

Yu C. (2013). ""The unusual BLIS activities of Streptococcus Salivarius strain pirie"." University of Otago.

Zheng, J. and Z. R. Zhou (2006). "Effect of age on the friction and wear behaviors of human teeth." *Tribology International* 39(3): 266-273.

Zheng, J. and Z. R. Zhou (2007). "Friction and wear behavior of human teeth under various wear conditions." *Tribology International* 40(2): 278-284.

Apêndice 1

Microbiologia

As células bacterianas podem ser caracterizadas em termos da sua forma, estrutura e arranjo. Relativamente à forma as mais comuns são: cocos (células de forma esférica), bacilos (célula em forma de bastonetes) e espirilos (células em forma de espiral) (Figura 39)(Carvalho I. 2010).

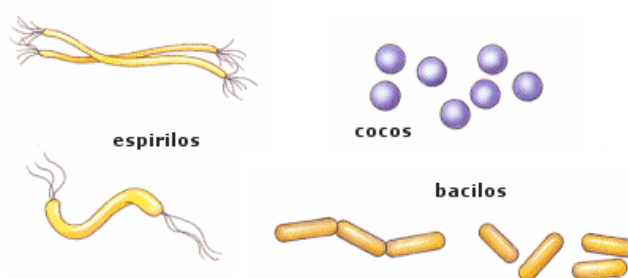


Figura 39 - Ilustração das diferentes formas de bactérias (adaptado de (Carvalho I. 2010))

Os cocos são bactérias de forma arredondada, achatadas ou alongada numa das extremidades e vivem em colónias ou isoladas. Estes podem formar pares, designados por diplococos, cachos, definidos como estafilococos ou cadeias, definidos como estreptococos. Os bacilos podem ser longos, espessos, curtos, com extremidades finas, ou arredondados de um dos lados. Por fim, os espirilos podem ser divididos em dois grupos: espiroquetas e espirilos que apresentam uma espiral incompleta, de difícil observação ao microscópio(Ferreira W. 1998, Bossolan N. 2002, Nascimento J. 2009, Carvalho I. 2010, Santos A. 2010).

Relativamente ao tamanho a unidade de medida das bactérias é o micrómetro, sendo que o seu tamanho varia, aproximadamente, de 0,5 a 1 μm (Ferreira W. 1998, Bossolan N. 2002, Nascimento J. 2009, Carvalho I. 2010, Santos A. 2010).

A nível estrutural as bactérias possuem parede celular, uma estrutura rígida que envolve a membrana citoplasmática e confere forma à célula bacteriana para além de a proteger de substâncias tóxicas e manter a pressão osmótica intrabacteriana impedindo o rompimento da célula(Ferreira W. 1998, Bossolan N. 2002, Nascimento J. 2009, Carvalho I. 2010, Santos A. 2010).

As bactérias podem ser classificadas de acordo com a constituição da sua parede celular por utilização do método de coloração Gram.

Nas Gram-positivas, apresentam uma cor azulada e tem uma parede celular muito espessa (entre os 20 a 80nm) e composta por várias camadas de peptideoglicano, covalentemente ligadas ao ácido teicóico, que faz parte da membrana celular, as células ficam coradas de vermelho(Ferreira W. 1998, Bossolan N. 2002, Nascimento J. 2009, Carvalho I. 2010, Santos A. 2010).

As Gram-negativas, apresentam uma cor avermelhada e contêm duas membranas, no meio das quais se pode encontrar uma camada de peptideoglicano (cerca de 9 a 20 nm) e ficam coradas de azul por aplicação do método(Ferreira W. 1998, Bossolan N. 2002, Nascimento J. 2009, Carvalho I. 2010, Santos A. 2010).

Apêndice 2

Meios de crescimento

Para o cultivo de microrganismos em laboratório é necessário conhecer as suas exigências nutricionais e as condições físicas específicas para que o crescimento ocorra. Normalmente os meios contêm peptonas, extrato de carne e/ou extrato de levedura (Tabela 6) e podem ser líquidos ou sólidos. Para se obter um meio sólido é necessário adicionar agar, uma vez que este componente funciona como agente solidificante (Ronald M. 1997).

Tabela 6 - Características e valor nutritivos de cada componente dos meios de cultura (adaptado de (Ronald M. 1997))

<i>MATÉRIA-PRIMA</i>	<i>CARACTERÍSTICAS</i>	<i>VALOR NUTRITIVO</i>
Extrato de Carne	Extrato aquoso de tecido muscular, concentrado sob a forma de pasta	Contém as substâncias solúveis dos tecidos animais, incluindo carboidratos, compostos orgânicos de nitrogénio, vitaminas hidrossolúveis e sais
Peptona	Produto que resulta de digestão de materiais proteicos como carne, caseína e gelatina; a digestão proteica é realizada por meio de ácidos ou de enzima; existem muitas peptonas diferentes (dependendo da proteína usada e do métodos de digestão) para uso em meios bacteriológicos; as peptonas diferem em suas propriedades de promover o crescimento	Principal fonte de nitrogénio orgânico; pode conter algumas vitaminas e, às vezes, carboidratos, dependendo do tipo de material proteico digerido
Agar	Carboidrato complexo, obtido de certas algas marinhas; utilizado para a remoção de substância estranhas	Usado como agente solidificante dos meios; o agar, dissolvido em soluções aquosas, gelifica quando a temperatura é reduzida a menos de 45°C; não é considerado como fonte nutritiva para as bactérias
Extrato de levedo	Extrato aquoso de leveduras comercialmente apresentado sob a forma de pó	Fonte muito rica de vitamina B, também contém compostos orgânicos de nitrogénio e de carbono

De acordo, com a função pretendida os meios de cultura podem ser classificados como(Ronald M. 1997):

1. Meios enriquecidos, em que são adicionados sangue, extrato de tecidos ou de animais a fim de fornecer todos os nutrientes necessários ao crescimento de determinados microrganismos;
2. Meios seletivos, em que a adição de determinadas substâncias impede/previne o crescimento de grupos de bactérias indesejados;

3. Meios diferenciais, em que são associados determinados reagentes químicos (indicadores) que atuam de modo a originar um tipo de crescimento ou modificação (normalmente coloração), permitindo distinguir os diversos tipos de microrganismos presentes.

Apêndice 3

Crescimento microbiano

O crescimento bacteriano é o aumento do número de células de uma população. As células dividem-se de forma assexuada, por fissão binária ou cissiparidade (Figura 3. 1). Ocorre a replicação do cromossoma bacteriano, originando uma parede celular transversa, formando duas novas células idênticas à original. Desta forma, uma célula dá duas, duas dão quatro, quatro dão oito e assim sucessivamente. A taxa de crescimento é definida pela variação do número de células por unidade de tempo (Ronald M. 1997, Ferreira W. 1998, Bossolan N. 2002).

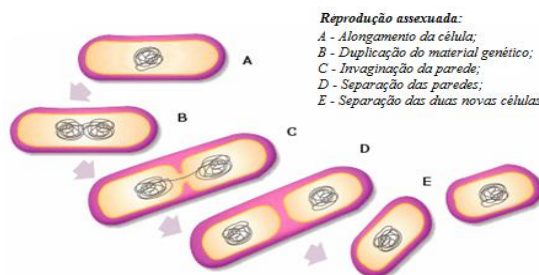


Figura 3. 1 - Etapas do crescimento microbiano (adaptado de <http://2.bp.blogspot.com/-ESqj5leDUG8/UEd00hH75-I/AAAAAAAAAAk/C3xFVpu2XCg/s1600/vsev.png>)

Uma curva de crescimento típica (Figura 3. 2) pode ser dividida em quatro fases principais: (1) fase lag, (2) fase exponencial, (3) fase estacionária e (4) fase de declínio ou morte (Ronald M. 1997, Ferreira W. 1998, Bossolan N. 2002).

1. Esta fase caracteriza-se por não existir crescimento bacteriano. Como o inóculo provém de uma cultura mais velha, que se encontra em fase estacionária, existe inicialmente uma fase de adaptação. As células encontram-se com falta de nutrientes e quando colocadas em meio novo, levam algum tempo para conseguirem sintetizar os componentes de que necessitam;
2. Esta fase caracteriza-se pela divisão constante das células, resultando num aumento exponencial da população. Graficamente esta fase é representada por uma reta ascendente que relaciona o logaritmo do número de células com o tempo. É uma fase de intensa multiplicação que termina quando se esgotar um dos nutrientes essenciais;

3. Nesta fase o número de células permanece constante ao longo do tempo. Existe um equilíbrio entre a taxa de morte e de divisão e a sua duração é variável, dependendo do tipo de célula, do meio e das condições de cultivo;
4. Nesta fase a taxa de morte, por lise celular, começa a exceder a taxa de divisão levando a um decréscimo do número de células, entrando assim numa fase de declínio. A acumulação de resíduos do metabolismo leva à degradação das condições do meio favorecendo a morte celular.

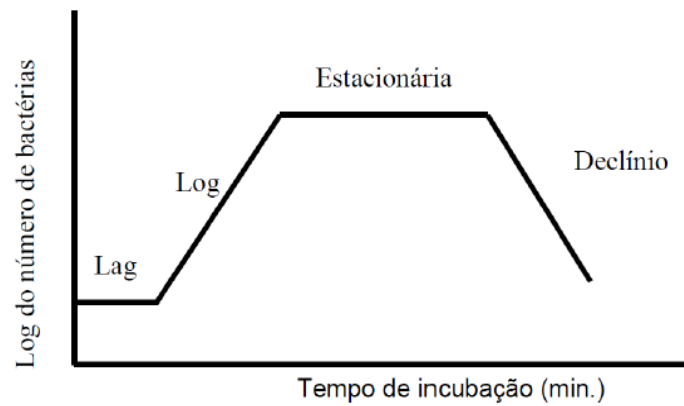


Figura 3. 2 - Curva de crescimento e respetivas etapas (adaptado de (Nascimento J. 2009))

Apêndice 4

MEV (Microscópio Eletrônico de Varrimento)

A microscopia eletrônica de varrimento (MEV) é uma técnica utilizada para observar a morfologia de bactérias e de superfícies e a relação entre ambas. Esta técnica é utilizada para visualizar bactérias, que compõem o biofilme, permitindo a visualização individual bem como o seu interior, no que diz respeito à sua morfologia e massa da superfície, duas características de extrema importância. Contudo, o MEV também se tem mostrado importante para entender a estrutura do biofilme, de forma a compreender a fisiologia e a ecologia destes sistemas microbianos.

No entanto, tal como todas as técnicas, o MEV apresenta vantagens e desvantagens. Como vantagens há a registrar a maior resolução na observação dos biofilmes bem como a capacidade de medição e quantificação em três dimensões. Como desvantagens, o fato das amostras necessitarem de um pré-tratamento e uma secagem, o que pode levar a alterações na morfologia da amostra como também alterações significativas do biofilme, por desidratação.

Contudo o MEV é considerado como sendo uma ferramenta fundamental, que permite estudar os efeitos das propriedades físico-químicas durante a adesão, tais como, o pH, a rugosidade, a temperatura, e desempenha também um papel fundamental na percepção da fisiologia, da espessura e da estrutura tridimensional das células microbianas.